

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUSTAVO COLOMBO DAL PONT

**ENVOLVIMENTO DA GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 NO
TRANSTORNO BIPOLAR: UMA PESQUISA TRANSLACIONAL**

CRICIÚMA

2021

GUSTAVO COLOMBO DAL PONT

**ENVOLVIMENTO DA GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 NO
TRANSTORNO BIPOLAR: UMA PESQUISA TRANSLACIONAL**

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.

Orientadora: Prof. Dra. Samira da Silva Valvassori.

Coorientador: Prof. Dr. João Quevedo.

CRICIÚMA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D149e Dal Pont, Gustavo Colombo.

Envolvimento da glicogênio sintase quinase 3 no transtorno bipolar : uma pesquisa translacional / Gustavo Colombo Dal Pont. - 2021.

91 p. : il.

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

Orientação: Samira da Silva Valvassori.

Coorientação: João Quevedo.

1. Transtorno bipolar - Tratamento. 2. Ouabaína. 3. Quinase 3 da Glicogênio Sintase - Efeito fisiológico. 4. Glicogênio Sintase Quinase 3 beta. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

FOLHA INFORMATIVA

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

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

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

Catarinense – UNESC.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, em especial aos meus pais, Neilôr e Lourdes, por todo apoio que me deram durante toda a minha vida, me auxiliando, aconselhando, permitindo assim, que eu pudesse ter uma excelente formação. Se não fosse pelo esforço e dedicação deles, provavelmente todo esse caminho não seria possível, ou se daria de forma diferente. Sinto muito orgulho dos dois, de tudo que conquistaram, e abriram mão também para que meu irmão e eu pudéssemos chegar aonde chegamos.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de trabalho, que ao longo do tempo se tornaram grandes amigos. Agradecer em especial ao Wilson, que se tornou um de meus melhores amigos, me auxiliando em absolutamente tudo, tanto no trabalho quanto na vida pessoal. Sou muito grato por tê-lo conhecido. Ao Roger, que me ensinou muita coisa, tanto no âmbito científico, quanto em aspectos para levar para a vida. À Fernanda, que se tornou uma grande amiga desde os tempos da graduação, e que nos últimos momentos no laboratório foi minha maior parceira. À minha orientadora Samira, por tudo que me ensinou e auxiliou durante todos esses anos. Ao meu coorientador João, por tudo que possibilitou durante essa trajetória. E aos demais colegas do laboratório, que são muitos, por toda parceria, brincadeiras, risadas que demos juntos durante todo esse tempo.

Gostaria de agradecer aos membros da banca, pelo aceite e pela disponibilidade de avaliar e contribuir para este trabalho. Gostaria também de agradecer ao PPGCS da UNESC, por tudo que possibilitou durante todo esse tempo. Gostaria de agradecer a todos os professores do PPGCS, por tudo que contribuíram para a minha formação. Em especial a professora Alexandra, que também faz parte do laboratório, e se tornou uma grande amiga também.

Por fim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que estiveram a minha volta durante todos esses anos, proporcionando ótimos momentos, ajudando nas dificuldades, e compartilhando momentos felizes. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos vocês.

“Nunca se vence uma guerra lutando sozinho”

RAUL SEIXAS

RESUMO

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno crônico e recorrente, caracterizado por alterações de humor, o qual tem como marco clínico a presença de um ou mais episódios de mania. Estudos mostraram alterações no volume cerebral de pacientes com TB, que podem sofrer perda e/ou atrofia neuronal em regiões como córtex pré-frontal e hipocampo. Estudos também sugerem um envolvimento da enzima sódio-potássio de adenosina trifosfatase ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$) na fisiopatologia do TB. A atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ pode ser inibida pela ouabaína (OUA), o que pode ativar cascatas de sinalização, como da glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3). Além disso, pode induzir danos fisiológicos como estresse oxidativo. A modulação de GSK-3 pode atenuar alterações comportamentais em modelos animais. O AR-A014418 (inibidor da GSK-3 β) modula comportamentos em modelos animais em estudos de TB. Objetivou-se com o presente estudo investigar os efeitos do AR-A014418 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo animal de mania induzido por OUA, assim como a atividade de GSK-3 β e parâmetros de estresse oxidativo em células de pacientes com TB. O experimento foi dividido em duas etapas: Desenho experimental I (pré-clínico), e desenho experimental II (clínico). No desenho experimental I, 32 ratos Wistar foram submetidos a um modelo animal de mania induzido por injeção intracerebroventricular (ICV) de OUA, e tratados com uma única injeção ICV de AR-A014418. Nesse protocolo, foram avaliadas as alterações comportamentais, assim como parâmetros de estresse oxidativo, sendo eles a produção de superóxido em partículas submitocondriais, níveis de hidroperóxido lipídico (LPH), 4-hidroxinonenal (4-HNE), 8-isoprastano (8-ISO), carbonilação de proteínas, 3-nitrotirosina, assim como a atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), no córtex frontal e no hipocampo dos animais. No desenho experimental II, foram utilizados linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis, e posteriormente avaliados a atividade de GSK-3 β e parâmetros de estresse oxidativo, sendo eles os níveis de 4-HNE e 8-ISO. No desenho experimental I, foi observado que a administração OUA induziu comportamento do tipo maníaco nos animais, o qual foi revertido pela administração de AR-A014418. Além disso, a OUA aumentou os níveis de superóxido de partículas submitocondriais, LPH, 4-HNE, 8-ISO, proteínas carboniladas, 3-nitrotirosina e atividade SOD, GPx, e GR no córtex frontal e hipocampo dos animais. Em geral, o tratamento com AR-A014418 reverteu os efeitos da OUA sobre todos os parâmetros avaliados, com exceção das atividades de GPx e GR. Além disso, a OUA diminuiu a atividade da CAT e o AR-A014418 aumentou a atividade dessa enzima em ambas

as estruturas avaliadas. No desenho experimental II foram avaliados um total de 82 participantes, sendo 46 do grupo controle e 36 pacientes com TB. Não foi observado diferença significativa na atividade de GSK-3 β entre os pacientes e o grupo controle. No entanto, foi observado um aumento dos biomarcadores de dano oxidativo 4-HNE e 8-ISO nos pacientes com TB quando comparados ao grupo controle. Ao analisar a correlação estatística, observou-se uma correlação negativa entre os dois biomarcadores e a atividade da GSK-3 β . Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a inibição da GSK-3 β pode modular comportamento tipo-maníaco. Também pode ser sugerido que a inibição da GSK-3 β pode ser efetiva contra estresse oxidativo. Apesar de não ter sido observado diferença significativa na atividade de GSK-3 β entre pacientes e controles, o presente estudo permitiu observar a relação entre a sua atividade e alterações biológicas que acontecem nos pacientes com TB, bem como entender melhor a importância desses mecanismos. Entretanto mais estudos são necessários para melhor elucidar esses mecanismos, assim como são necessários para melhor caracterizar o papel da GSK-3 β e sua influência no TB.

Palavras-chave: Transtorno Bipolar; Ouabaína; GSK-3; AR-A014418; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a chronic and recurrent mood disorder, characterized by mood alterations, which the clinical mark is the presence of one or more manic episodes. Studies showed alterations in the volume of the brain of BD patients, which can show loss and/or neuronal atrophy in brain regions like the pre-frontal cortex and hippocampus. Studies also showed the involvement of sodium-potassium adenosine triphosphatase ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$) in BD pathophysiology. The $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity can be inhibited by ouabain (OUA), which can activate signaling pathways, such as the glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) pathway. Moreover, can induce physiological damages like oxidative stress. The modulation of GSK-3 can attenuate behavioral alterations in animal models. AR-A014418 (GSK-3 inhibitor) modulate behaviors in animal models of BD studies. The present study aimed to evaluate the effects of AR-A014418 on behavioral and biochemical parameters in an animal model of mania induced by OUA, as well as GSK-3 β activity and oxidative stress parameters in cells of BD patients. This study was divided into two parts: experimental design I (preclinical) and experimental design II (clinical). In the experimental design I, 32 male wistar rats, 60 days old, were submitted to an animal model of mania induced by intracerebroventricular (ICV) administration of OUA, and treated with a single ICV injection of AR-A014418. In this protocol, was evaluated the behavioral alterations, as well as oxidative stress parameters, being them superoxide production in submitochondrial particles, levels of lipidic hydroperoxide (LPH), 4-hydroxynonenal (4-HNE), 8-isoprostane (8-ISO), protein carbonyl contents, 3-nitrotyrosine, as well as activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), in frontal cortex and hippocampus of the animals. In the experimental design II, were used lymphocytes of BD patients and healthy controls, and after evaluated the activity of GSK-3 β and oxidative stress parameters, being them 4-HNE and 8-ISO levels. In the experimental design I, was observed that the administration of OUA induced manic-like behavior in the animals, which was reversed by administration of AR-A014418. Furthermore, OUA increased the superoxide production in submitochondrial particles, and levels of LPH, 4-HNE, 8-ISO, 3-nitrotyrosine and protein carbonyl contents, as well as activities of SOD, GPx and GR in the frontal cortex and hippocampus of the animals. In general, the treatment with AR-A014418 reversed the effects of OUA on all parameters evaluated, except on the GPx and GR activities. In addition, OUA decreased the activity of CAT, and treatment with AR-A014418 reversed this effect in both structures evaluated. In the experimental design II were evaluated 82 participants, being

46 healthy controls and 36 BD patients. Did not was observed significant difference in the GSK-3 β activity between BD patients and healthy controls. However, was observed increases in the 4-HNE and 8-ISO levels in the BD patients when compared to healthy controls. When analyzing the statistical correlation, was observed a negative correlation between both biomarkers and activity of GSK-3 β . In conclusion, the results founded in the present study suggest that the inhibition of GSK-3 β can modulate manic-like behavior. Also, can be suggested that the inhibition of GSK-3 β can be effective against oxidative stress. Although did not was observed significant difference in the GSK-3 β activity between BD patients and healthy controls, the present study allowed observe the relationship of your activity and biological alterations in the BD patients, as well as understand better the importance of these mechanisms. However, more studies are necessary to characterize the role of GSK-3 β and your influence in BD better.

Keywords: Bipolar Disorder; Ouabain; GSK-3; AR-A014418; oxidative stress.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

3-Nitro: 3-nitrotirosina

4-HNE: 4-hydroxynonenal

8-ISO: 8-isoprostano

ACSF: líquido cefalorraquidiano artificial (do inglês: *artificial cerebrospinal fluid*)

AR-A014418: N-(4-metoxibenzil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-ureia

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: *brain-derived neurotrophic factor*)

CAT: catalase

CMSP: células mononucleares do sangue periférico

EO: estresse oxidativo

ERK: quinase regulada por sinal extracelular (do inglês: *extracellular signal-regulated kinases*)

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

FDA: *Food and Drug Administration*

GPx: glutational peroxidase

GR: glutational redutase

GSH: glutational reduzida

GSK-3: glicogênio sintase quinase 3

GSSG: glutational oxidada

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

ICV: intracerebroventricular

ISRS: inibidores seletivos da recaptação de serotonina

Li: lítio

LPH: Hidroperóxido lipídico (do inglês: *lipid hydroperoxide*)

mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês: *mammalian target of rapamycin*)

Na⁺K⁺ATPase: sódio-potássio de adenosina trifosfatase

OMS: Organização Mundial de Saúde

ON: óxido nítrico

ONOO: peroxinitrito

OUA: ouabaína

PKC: proteína quinase C (do inglês: *protein kinase C*)

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TB: transtorno Bipolar

UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense

VPA: valproato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 O TRANSTORNO BIPOLAR	14
1.2 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR.....	15
1.2.1 Na ⁺ K ⁺ ATPase.....	15
1.2.2 Estresse Oxidativo	16
1.2.3 Sinalização celular e GSK-3	17
1.3 TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR.....	19
1.3.1 AR-A014418	20
1.4 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TRANSTORNO BIPOLAR.....	21
1.4.1 Modelos animais de Transtornos Psiquiátricos	21
1.4.1.1 Modelo animal de mania induzido por ouabaína.....	22
1.5 JUSTIFICATIVA	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	25
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL I – EXPERIMENTO PRÉ-CLÍNICO	25
3.2.1 Animais.....	25
3.2.2 Procedimento Cirúrgico.....	25
3.2.3 Administração e Tratamento.....	26
3.2.4 Teste do Campo Aberto	27
3.2.5 Amostras Cerebrais.....	28
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL II – EXPERIMENTO CLÍNICO.....	28
3.3.1 Aspectos Éticos.....	28
3.3.2 Amostra	28
3.3.3 Local de Execução	29
3.3.4 Triagem	29
3.3.4.1 Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV Transtornos do Eixo I - SCID – I.....	29
3.3.4.2 Escala Young para mania	29
3.3.4.3 Escala de Hamilton para Depressão	30
3.3.5 Critérios de Inclusão	30

3.3.6 Critérios de Exclusão	30
3.3.7 Eventos Adversos.....	30
3.3.8 Registro e Armazenamento de Dados.....	31
3.3.9 Término do Estudo	31
3.3.10 Protocolo para isolamento de linfócitos.....	31
3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	32
3.4.1 Isolamento mitocondrial	32
3.4.2 Produção de superóxido em partículas submitocondriais	32
3.4.3 Mensuração de peroxidação lipídica	33
3.4.4 Hidroperóxido lipídico (LPH)	33
3.4.5 Carbonilação de proteínas	33
3.4.6 3-Nitrotirosina (3-nitro)	34
3.4.7 Atividade das enzimas antioxidantes	34
3.4.8 Atividade de GSK-3 em linfócitos de pacientes com TB.....	35
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
4 RESULTADOS	36
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL I.....	36
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL II	48
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	82
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	83
APÊNDICE B – DEVOLUÇÃO AOS PARTICIPANTES	86
ANEXOS	88
ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	89
ANEXO II – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA E HUMANOS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TRANSTORNO BIPOLAR

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno crônico e recorrente, caracterizado por alterações de humor, o qual pode ser subdividido em tipo I (episódios de mania intercalados por episódios de depressão) ou tipo II (episódios de hipomania intercalados por episódios de depressão), os quais podem ocorrer de forma mista ou isolada, assim como períodos de eutímia (Keck et al., 2001; Murray et al., 2011; American Psychiatric Association, 2013). Além disso, também existe o Transtorno Ciclotímico, onde o paciente apresenta sintomas hipomaniacos que não contemplam os critérios para diagnóstico de um episódio hipomaniaco, assim como sintomas depressivos que não contemplam os critérios para diagnosticar um episódio depressivo (American Psychiatric Association, 2013; Bosaipo et al., 2017).

A idade média para o início dos sintomas é de 18 anos para o tipo I, enquanto para o tipo II é de 25 anos (Bosaipo et al., 2017). O TB afeta 1 a 3% da população mundial, apresentando no Brasil uma prevalência geral de 2,1%, sendo que do tipo I apresenta prevalência de 0,9%, enquanto o TB do tipo II prevalência de 0,2% (Viana e Andrade 2012; de la Vega et al., 2018). De acordo com o DSM-V (2013), a porcentagem dos pacientes com TB-II que acabam desenvolvendo um episódio de Mania e, conseqüentemente, têm o diagnóstico alterado para TB-I varia entre 5 e 15%. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ficando apenas atrás da depressão e esquizofrenia, o TB é a sexta maior causa de incapacidade e a terceira entre as doenças mentais (Costa, 2008). Além disso, por conta da troca constante entre os episódios de humor, o TB é acompanhado de danos ocupacionais e psicossociais (Yasuyama et al., 2017).

O marco clínico para o diagnóstico do TB, segundo os critérios do DSM-V (2013), é a presença de um ou mais episódios de mania, onde o paciente apresenta humor elevado, irritável ou expansivo, autoestima elevada, redução da necessidade do sono, fuga de ideias, entre outras características, as quais devem persistir por um tempo mínimo de uma semana. Os sintomas dos episódios hipomaniacos se assemelham aos de um episódio maniaco, porém diferem na intensidade e duração de cada um, não causando prejuízo funcional e não havendo necessidade de hospitalização. Em contrapartida, durante um episódio depressivo, o paciente apresenta humor deprimido na maior parte do dia, diminuição de interesse ou prazer nas atividades, diminuição da capacidade de concentração, perda de energia, entre outras características (American Psychiatric Association, 2013).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR

Apesar dos avanços nos estudos, a fisiopatologia do TB ainda não é totalmente compreendida. Estudos de neuroimagem estrutural mostraram alterações no volume cerebral de pacientes com TB, sugerindo que esses pacientes podem sofrer de perda e/ou atrofia neuronal em regiões como córtex pré-frontal e temporal, amígdalas, entre outras (Altshuler et al., 1991; Sheline et al., 1998; Blumberg et al., 1999; Frey et al., 2004). Além disso, são observadas anormalidades neuroanômicas em pacientes com TB, tais como alargamento dos ventrículos e perda de massa cinzenta no hipocampo (Otten e Meeter, 2015; Hallahan et al., 2016).

O TB possui uma etiologia multifatorial, onde são encontrados fatores genéticos e ambientais, assim como sistemas e vias de sinalização intracelular que podem modular esse transtorno, e levando a diversas alterações fisiológicas, tais como disfunções mitocondriais, inflamação e estresse oxidativo (EO) (De Berardis et al., 2006; Fries et al., 2012; Schneider e Prvulovic, 2013; Hamdani et al., 2013; Erdem et al., 2014; Morris et al., 2017; Cikankova et al., 2017). Dentro disso, pode-se citar a teoria da disfunção monoaminérgica, assim como alterações epigenéticas (as quais incluem diversos mecanismos que podem alterar a expressão gênica sem modificar a sequência do DNA) (Haase e Brown, 2014; Jun et al., 2014; Guintivano e Kaminsky, 2014; Peña et al., 2014). Além dessas hipóteses, estudos também sugerem um envolvimento da sódio-potássio de adenosina trifosfatase ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$) na fisiopatologia do TB (Traub e Lichtstein, 2000).

1.2.1 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$

A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é uma enzima de membrana presente em células eucarióticas, responsável pelo transporte dos íons de potássio (K^+) para o interior da célula, e bombeamento dos íons de sódio (Na^+) para o meio extracelular (Clausen et al., 2017). Esta enzima é um hetero-oligômero composto por dois polipeptídeos principais, sendo eles as subunidades α e β (Blanco e Mercer, 1998). Estudos anteriores demonstraram que alterações nas isoformas α da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ podem provocar mudanças comportamentais, tais como aumento ($\alpha 1$) ou diminuição ($\alpha 2$) de atividade locomotora, assim como aumento em comportamento do tipo ansioso em roedores (Moseley et al., 2007; Lingrel et al., 2007).

A atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ pode ser inibida através de esteroides cardíacos, como por exemplo, a ouabaína (OUA) e a digoxina (Lichtstein et al., 2018). A inibição da

$\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ pode resultar na ativação de cascatas de sinalização, como por exemplo, quinase regulada por sinal extracelular (ERK), Akt, glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), proteína alvo da rapamicina em mamíferos (m-TOR), entre outras (Kim et al., 2013; Lichtstein et al., 2018). Essas alterações podem levar a crescimento e proliferação celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), inflamação, entre outras alterações (Xie et al., 1993; Xie e Cai, 2003).

1.2.2 Estresse Oxidativo

As EROs são compostos químicos que possuem elétrons desemparelhados contendo uma molécula de oxigênio que atua como metabólitos reativos e radicais livres. Quando os níveis de ERO superam os mecanismos de defesa antioxidante do organismo, ocorre o chamado estresse oxidativo (EO), o que pode ser considerado uma ameaça para as células, levando a oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (Chen et al., 2015; Rana e Singh, 2018). Esses danos celulares podem ser observados através de marcadores, como 4-hydroxynonenal (4-HNE), 8-isoprostano (8-ISO) e morte celular (Lantos et al., 1994; Bavaresco et al., 2018).

A mitocôndria exerce um papel importante na produção de energia para as células, e disfunções nessa organela são muito estudadas na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, como por exemplo, o TB (Halliwell e Gutteridge, 1999; Blass e Brown, 2000; Rollins et al., 2009; Steckert et al., 2010; Okusaga, 2013; Moylan et al., 2014). Na mitocôndria ocorre um fenômeno chamado fosforilação oxidativa, o qual leva a produção de ERO (Marnett, 1999; Berk et al., 2011). O óxido nítrico (ON) e o peroxinitrito (ONOO^-) são exemplos de espécies reativas de nitrogênio (ERN), que também podem causar danos a biomoléculas (Eom e Joep, 2009; Barbosa et al., 2014). O produto mais nocivo para as células, resultante da reação do ânion superóxido e do ON, é biomarcador específico 3-nitrotirosina (3-Nitro) (Beurel e Joep, 2006).

Estudos sugerem que as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione são eficazes no sistema de defesa antioxidante primário (**Figura 1**) em transtornos psiquiátricos, como por exemplo no TB e na esquizofrenia (Okusaga, 2013). Além disso, dentre as principais enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante encontram-se a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GR). A GPx oxida a glutathione reduzida (GSH), transformando-a em glutathione oxidada (GSSG) através da remoção do H_2O_2 . Através

da utilização de NADPH como poder redutor, a GR faz a regeneração da GSH a partir da GSSG (Pero et al., 1990; Davies, 1995; de Sousa et al., 2014).

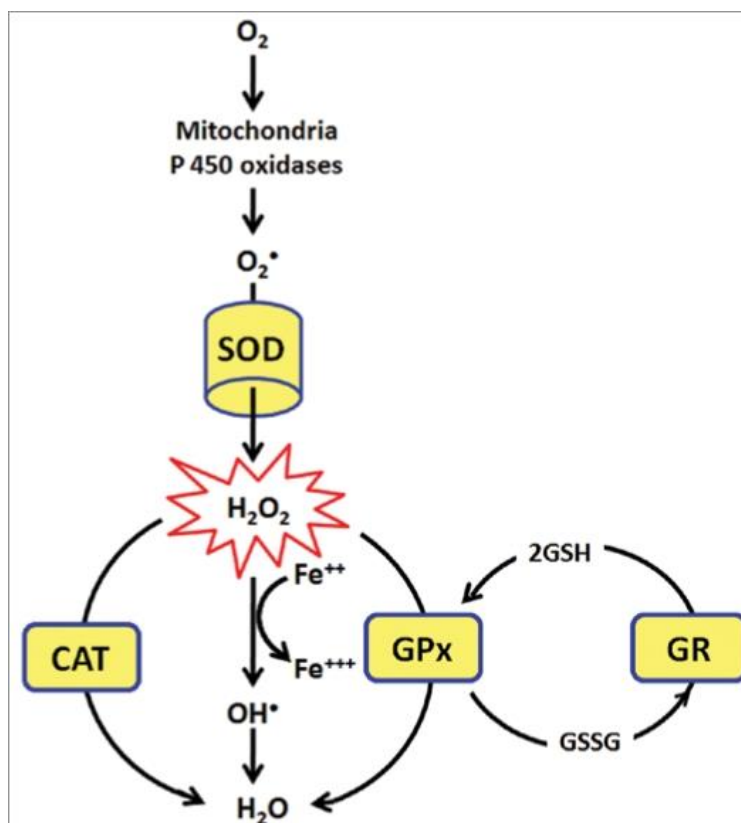


Figura 1: Sistema de defesa antioxidante enzimático. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^\bullet$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). GPx neutraliza o H_2O_2 , capturando hidrogênios de duas moléculas GSH, resultando em duas moléculas de água (H_2O) e uma de GSSG. A GR regenera a GSH a partir da GSSG. A CAT transforma H_2O_2 em H_2O . SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GPx = glutathione peroxidase; GR = glutathione redutase; GSH = glutathione reduzida; GSSG = glutathione oxidada. Pandey e Rizvi (2010).

As ERO geradas durante o processo de EO exercem funções intracelulares, através da modulação de cascatas de sinalização, como por exemplo vias de GSK-3. Esse processo ocorre quando as ERO impedem a ativação da Akt, fazendo com que a GSK-3 permaneça ativada dentro da célula. Essa ação pode ter como consequência a fosforilação da proteína de ligação com elemento resposta de cAMP (CREB), alterando sua conformação e impedindo sua ligação com proteínas de ligação com CREB (CBP), o que leva a inibição da produção de citocinas anti-inflamatórias (Rana e Singh, 2018).

1.2.3 Sinalização celular e GSK-3

A resposta comportamental frente a diferentes estímulos envolve diferentes etapas, sendo elas: a identificação do estímulo, a produção de uma resposta afetiva frente a

este estímulo, e a regulação dessa resposta afetiva (Phillips et al., 2003). Para que esses processos ocorram é necessário que as células se comuniquem umas com as outras, através de um processo denominado sinalização celular. A sinalização celular nada mais é do que a interação de um ligante (enviado por uma célula) com um receptor (de outra célula), como ocorre, por exemplo, entre células neuronais. Essa comunicação promove processos de modulação de sistemas intracelulares, tais como ativação de cascatas de sinalização (Cooper, 2001). Esses processos intracelulares ocorrem através de vias metabólicas, que podem ser ativadas ou desativadas através da atividade de enzimas que adicionam (quinases) ou retiram (fosfatases) grupos fosfatos (Idris et al., 2001; Schaan, 2003).

A GSK-3 é uma serina/treonina quinase, inicialmente descoberta por atuar na síntese do glicogênio, que possui um funcionamento diferente da maioria das quinases, pois se encontra constantemente ativada dentro da célula. Existem duas isoformas de GSK-3 em mamíferos, sendo elas a GSK-3 α e GSK-3 β . Ambas atuam na regulação de processos de apoptose e de plasticidade celular (Crowder e Freemam, 2000; Zhao et al., 2007). A GSK-3 β , quando fosforilada em serina 9, altera sua conformação, ligando a região N-terminal ao domínio catalítico, o que impede a ligação de um substrato e, conseqüentemente, inibe a sua atividade (Doble e Woodgett, 2003; Beurel et al., 2015). Esta enzima pode ser tradicionalmente encontrada no citosol. Porém, também pode ser encontrada em outros compartimentos intracelulares, como por exemplo, na mitocôndria e no núcleo (Beurel et al., 2015).

A literatura demonstra que uma atividade aumentada de GSK-3 pode induzir processos apoptóticos, assim como a inibição da sua atividade pode atenuar ou prevenir apoptose (Gould et al., 2006). Além disso, a GSK-3 pode interagir com diversas vias de sinalização, tais como PI3K/Akt, MAPK, Wnt, entre outras (**Figura 2**) (Doble e Woodgett, 2003; Valvassori et al., 2017a).

Estudos que demonstraram ação inibitória do lítio (Li) sobre a GSK-3 β , despertaram um interesse em estudar essa enzima como alvo terapêutico para transtornos psiquiátricos (Klein e Melton, 1996). Evidências mostraram um envolvimento de atrofia celular e diminuição de plasticidade sináptica no TB, e que a administração de Li exerce efeitos protetores (Coyle e Duman, 2003). Além disso, modelos animais genéticos e farmacológicos vêm demonstrando que a manipulação de cascatas de sinalização de GSK-3 β pode produzir efeitos antimaníacos e antidepressivos (Gould et al., 2004; Prickaerts et al., 2006; Valvassori et al., 2017a).

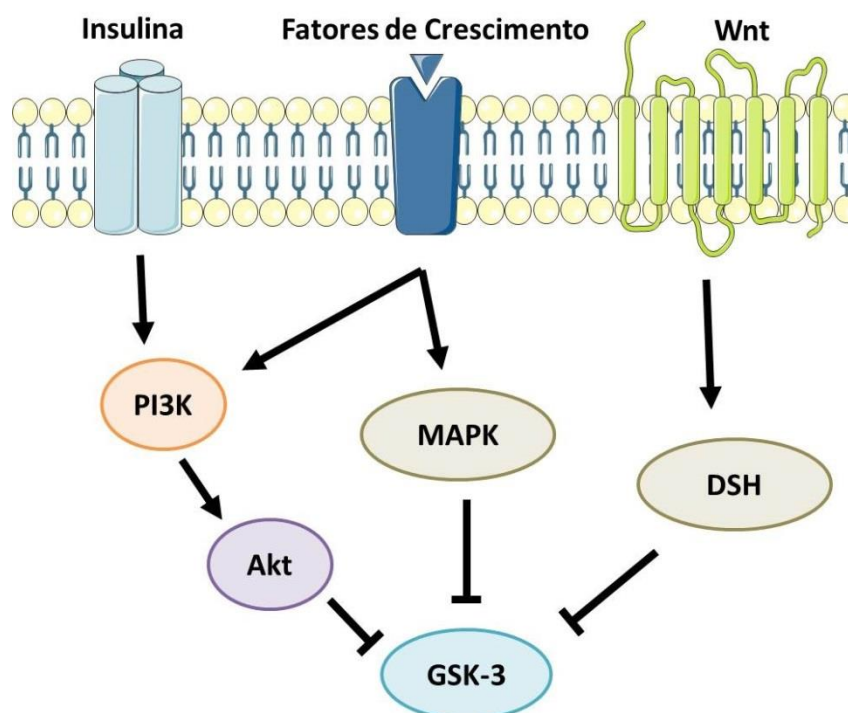


Figura 2: Vias de sinalização PI3K/Akt, MAPK e Wnt interagindo com GSK-3. A Ativação de PI3K, Akt, MAPK e DSH, através de sinais enviados pelos receptores de insulina, fatores de crescimento e via Wnt modulam a atividade GSK-3. PI3K = fosfatidilinositol-3-quinase; AKT = Proteína quinase B; GSK-3 = glicogênio sintase kinase 3; MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno; DSH = *dishvelled*. Do autor (2019).

1.3 TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR

Considerando a alternância entre os dois estados de humor presente no TB, o tratamento para os pacientes se torna uma tarefa altamente complexa por exigir estratégias distintas para cada fase do transtorno (Cheniaux, 2011). Segundo Cheniaux (2011), o Li, primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), é considerado o padrão ouro no tratamento para pacientes com TB. Os principais mecanismos de ação do Li que vêm sendo reportados são seus efeitos regulatórios sobre vias de GSK-3, níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), níveis de cálcio intracelular, efeitos antioxidantes, modulação de citocinas, neurotransmissores, apoptose, entre outros (Macêdo et al., 2013; Emamghoreishi et al., 2015; de Sousa et al., 2015; Won e Kim, 2017). Apesar de estar no mercado a mais de 60 anos, o lítio ainda é o principal tratamento para episódios agudos de mania, depressão e episódios mistos, tendo em vista seus diversos mecanismos de ação (Won e Kim, 2017). Além disso, é a primeira escolha para a manutenção do TB (Weisler et al., 2011).

Além do Li, outros medicamentos podem ser usados no tratamento do TB, como por exemplo, clorpromazina, carbamazepina, valproato de sódio (VPA) entre outros para episódios de mania, e fluoxetina, quetiapina entre outros medicamentos para episódios depressivos (Azorin e Kaladjian 2009; Fountoulakis et al., 2007). Entretanto, ainda se nota uma limitação na eficácia dos tratamentos farmacológicos já existentes. Sendo assim, a busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento do TB ainda é um grande desafio para os pesquisadores. Por isso, estudos pré-clínicos avaliando moléculas específicas como novos alvos terapêuticos vêm ganhando grande notoriedade na ciência.

Estudos com animais mostraram que a superexpressão de GSK-3 β proporcionou um comportamento de hiperatividade, o qual é considerado um comportamento do tipo maníaco (Prickaerts et al., 2006). O AR-A014418, um inibidor da GSK-3 β , administrado de forma intracerebroventricular (ICV) reduziu a imobilidade no teste de nado forçado e atenuou a hiperatividade induzida por anfetamina em ratos (Gould et al., 2004).

1.3.1 AR-A014418

O N-(4-metoxibenzil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-ureia (AR-A014418), obtido através da mistura de 2-amino-5-nitrothiazol, 4-methoxybenzylisocianato e N,N-dimetilformamida (**Figura 3**) é um inibidor competitivo da atividade de GSK-3 β . Este inibidor tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer efeitos no sistema nervoso central (SNC) (Bijur e Jope, 2003; Gould et al., 2006; Martins et al., 2011). É descrito que a inibição de GSK-3 β pelo AR-A014418 resulta na inativação de diversas vias de sinalização, tais como AKT/mTOR, ERK/Mnk1, ou também pode promover ativações de vias como p38/MAPK (Lee et al., 2021).

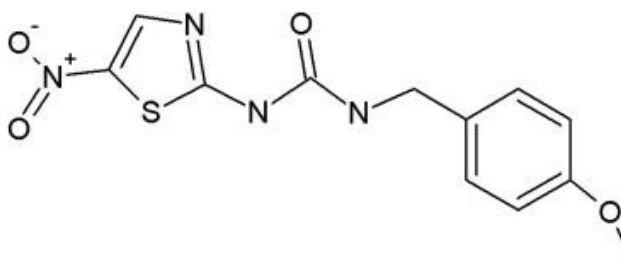


Figura 3: Fórmula estrutural do N-(4-metoxibenzil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-ureia (AR-A014418). Martins et al. (2011).

Estudos demonstram que o AR-A014418 pode possuir efeitos sobre a dor, uma vez que é capaz de atuar sobre condições como hiperalgesia. Além disso, também pode

prevenir apoptose, uma vez que inibe a atividade de GSK-3 β (Rashvand et al., 2020). Além disso, estudos utilizando o AR-A014418 vêm ganhando grande espaço na área da psiquiatria, pois exerce efeitos significativos em modelos animais de transtornos psiquiátricos, atenuando comportamentos do tipo maníaco ou depressivo em modelos induzidos por anfetamina ou ouabaína, tornando-se extremamente interessante para estudos de TB (Gould et al., 2004; Ludka et al., 2016; Bali e Jaggi, 2017; Valvassori et al., 2017a).

1.4 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TRANSTORNO BIPOLAR

Após a descoberta, triagem e formulação de um novo composto, ele precisa ser testado. Porém, para que novas substâncias com potenciais terapêuticos possam ser administradas em seres humanos de forma segura, essas substâncias devem passar pela fase de pesquisa pré-clínica. Sendo assim, estudos pré-clínicos são aqueles que correspondem à aplicação de um novo composto em cultura de células (*in vitro*) e/ou em animais (*in vivo*), a fim de avaliar seu potencial terapêutico. Nesta fase são obtidas informações preliminares da segurança do novo composto e sobre a sua atividade farmacológica (Ferreira et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011; Lavandeira, 2014).

Dentro desse contexto, pesquisadores ao longo dos anos vêm testando efeitos de fármacos clássicos e também de novas substâncias em culturas de células e modelos animais, a fim de desenvolver medicamentos mais eficientes e avaliar novos alvos terapêuticos para o tratamento do TB. Estudos *in vitro* demonstraram, por exemplo, que o tratamento com Li aumenta os níveis de BDNF, assim como pode exercer efeitos antioxidantes, o que reforça a importância dessa fase da pesquisa (De-Paula et al., 2016; Gawlik-Kotelnicka et al., 2016). Entretanto, esses efeitos ainda necessitam ser testados em organismos mais complexos, por isso, há a necessidade da utilização de modelos animais (Ministério da Saúde, 2011; Lavandeira, 2014).

1.4.1 Modelos animais de Transtornos Psiquiátricos

Os novos avanços neurobiológicos, genéticos e farmacológicos vêm possibilitando o desenvolvimento de modelos animais para estudos de transtornos psiquiátricos, os quais vêm se mostrando uma importante ferramenta para uma melhor compreensão de sistemas intracelulares que podem estar envolvidos na fisiopatologia desses transtornos (Manji e Chen, 2002; Einat et al., 2003; Valvassori et al., 2017b). Entretanto, para

um modelo animal de transtorno psiquiátrico ser considerado cientificamente válido, ele precisa atender a três validades fundamentais, descritas previamente por Ellenbroek e Cools (1990): a primeira delas é a validade de face, a qual consiste em mimetizar os sintomas do transtorno a ser estudado; a segunda é a capacidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos observados no transtorno; e a terceira é a validade preditiva, a qual consiste na reversão dos sintomas induzidos no modelo, através da utilização de fármacos utilizados no tratamento do transtorno em questão.

Apesar dos avanços nos estudos, até o momento, nenhum modelo animal, consegue mimetizar totalmente um determinado transtorno psiquiátrico. Principalmente o TB, considerando que esse transtorno apresenta um curso clínico com alterações de humor recorrentes e complexas, as quais incluem episódios maníacos, depressivos e mistos, o que acaba se tornando um desafio para o desenvolvimento de um modelo animal adequado (Machado-Vieira et al., 2004).

1.4.1.1 Modelo animal de mania induzido por ouabaína

O modelo animal de mania induzido pela administração ICV de OUA, um potente inibidor da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, já é bem caracterizado na literatura (El-Mallakh et al., 2003; Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011; Valvassori et al., 2017a). Além disso, os sintomas do tipo-maníaco (hiperatividade após a injeção ICV de OUA em ratos) permanecem por sete dias após uma única administração, conforme mostram estudos anteriores do grupo de pesquisa de TB do laboratório de psiquiatria translacional da UNESC (Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011; Valvassori et al., 2017a), contemplando a validade de face do modelo. Estudos anteriores mostraram um aumento de OUA endógena (glicosídeo produzido pela adrenal e pelo hipotálamo) no córtex parietal de pacientes com TB quando comparado com controles saudáveis (Goldstein et al., 2006). Além disso, estudos anteriores demonstraram uma diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em pacientes com TB em ambos os episódios, o que contempla a validade de construção do modelo (Coppen et al., 1966; Looney e El-Mallakh, 1997; Li e El-Mallakh, 2004).

Além da indução de hiperatividade, a administração de OUA após 14 dias induz aumento da imobilidade no teste de natação forçada, o que caracteriza desesperança, e também diminuição no teste de consumo de alimento doce, caracterizando anedonia, os quais são considerados comportamentos do tipo depressivo (Valvassori et al., 2019). Estes sintomas induzidos pela administração de OUA nos animais, podem ser prevenidos com a

administração de Li, contemplando a validade preditiva do modelo (Xue et al., 1997; Jornada et al., 2011; Valvassori et al., 2017a; Valvassori et al., 2017b). Considerando que o marco clínico do TB é a presença de pelo menos um episódio de mania, estudos pré-clínicos *in vivo* de TB utilizam primeiramente modelos de mania. Sendo assim, esses dados sugerem que o modelo animal induzido pela administração ICV de OUA pode ser considerado um bom modelo, pois contempla as três validades necessárias.

1.5 JUSTIFICATIVA

Apesar do TB ser um transtorno altamente incapacitante, que acomete grande parte da população, ainda se observa pouca evolução no seu tratamento desde sua descoberta, devido à carência de conhecimentos acerca da sua fisiopatologia. Há uma grande necessidade pela busca de novos alvos terapêuticos para o TB, tendo em vista a grande dificuldade no seu tratamento, pois a maioria deles visa tratar apenas os sintomas. Diante disso, uma grande variedade de estratégias para novos medicamentos e novos alvos terapêuticos ainda estão em desenvolvimento, buscando novos estabilizadores de humor com potencial terapêutico tanto para remissão de sintomas quanto proteção neuronal, porém necessitam de estudos mais elaborados. Tendo em vista o atual panorama do TB, além dos resultados significativos que a GSK-3 vem mostrando como possível alvo terapêutico, torna-se importante investigar os efeitos do AR-A014418 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo animal de mania induzido por OUA, assim como a atividade de GSK-3, níveis de 4-HNE e 8-ISO em linfócitos de pacientes com TB.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento da glicogênio sintase quinase 3 com parâmetros comportamentais e bioquímicos no transtorno bipolar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do AR-A014418 sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos do AR-A014418 sobre a produção de superóxido em partículas submitocondriais em ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos do AR-A014418 sobre os níveis de LPO, 4-HNE, 8-Isoprostano, Carbonilação de proteínas e 3-nitrotirosina em ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos do AR-A014418 sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR em ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os níveis de 4-HNE e 8-ISO, em linfócitos de pacientes com TB;
- Avaliar a atividade da GSK-3 em linfócitos de pacientes com TB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto somente teve início após aprovação pela comissão de ética no uso de animais – CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, protocolo nº 001/2016-1 (Anexo I). Além disso, também passou pela aprovação do comitê de ética em pesquisa e humanos – CEP da UNESC, protocolo nº 4.410.048 (Anexo II).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL I – EXPERIMENTO PRÉ-CLÍNICO

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com 60 dias (detalhamento descrito em seu respectivo desenho experimental), provenientes do biotério da UNESC. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno (41x34x16 cm), distribuídos em cinco ratos por caixa, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00h às 18:00h), com comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

Os animais foram divididos em 08 animais por grupo, distribuídos em 04 grupos experimentais, totalizando 32 animais.

3.2.2 Procedimento Cirúrgico

Para a realização da cirurgia estereotáxica, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg). No aparelho estereotáxico, foi removida a pele na região craniana do animal. Foi implantada uma cânula guia - de 1 mm - no ventrículo lateral a partir das seguintes coordenadas: 0,9 mm para trás do bregma, 1,5 mm à direita do bregma e 2,6 mm de profundidade (**Figura 4**). Foi utilizado acrílico dental para a fixação da cânula. Os animais ficaram em recuperação durante três dias antes dos outros procedimentos experimentais. Para minimizar o sofrimento dos animais, foram realizados os seguintes procedimentos pós-operatórios: 1) foi colocado aquecedor para

evitar hipotermia, que pode ocorrer por conta do anestésico utilizado no presente estudo; 2) os animais foram observados até acordarem para não se machucarem após a cirurgia; 3) os animais receberam uma única injeção intramuscular do analgésico Tramadol (10mg/kg), o qual possui efeitos que perduram por sete dias.

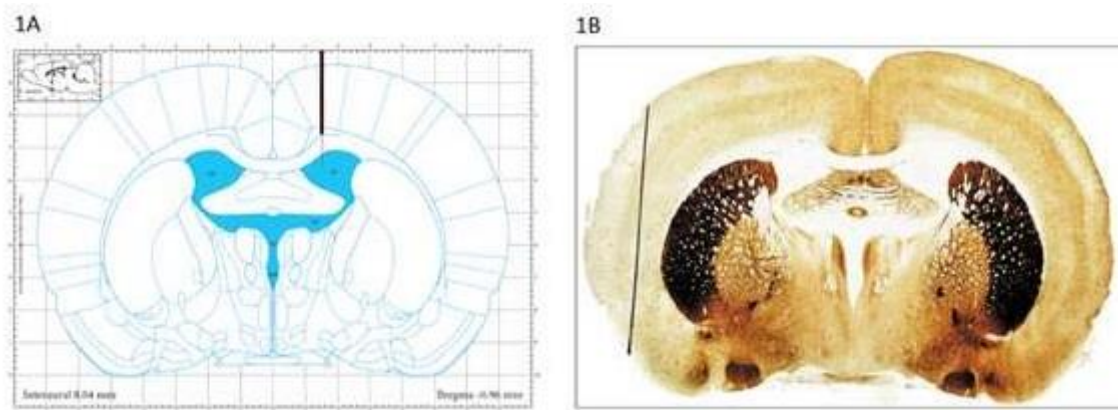


Figura 4: Corte histológico de localização da cânula. A: Representação esquemática da região administrada. A linha vertical preta representa a cânula guia implantada durante a cirurgia estereotáxica, e a linha vermelha representa a infusão da agulha no ventrículo lateral. B: Corte cerebral das áreas do ventrículo. Figura adaptada de Paxinos e Watson (2006).

3.2.3 Administração e Tratamento

Os animais receberam uma única injeção, via ICV, de 4µl de OUA 10^{-3} M, dissolvida em líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF), ou 4µl somente de aCSF. Juntamente com a administração dessas duas substâncias, os animais receberam 1µl de AR-A014418 (Sigma, cod A3230) (1,2mM) ou 1µl de ACSF. As injeções ICV de OUA, ACSF ou AR-A014418 foram administradas 72 h após a cirurgia (**Figura 5**). Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma: ACSF + ACSF; ACSF + AR-A014418; OUA + ACSF; OUA + AR-A014418. Sete dias após o ICV, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

A dose de AR-A014418 utilizada no presente estudo (1,2mM) foi baseada em Gould et al. (2004). No estudo de Gould et al (2004), foi demonstrado que a administração de AR-A014418 na dose de 30mmol/kg (i.p.) resulta em uma concentração cerebral de aproximadamente 1,2mM. Essa concentração foi capaz de reverter a hiperatividade induzida por anfetamina nos animais.

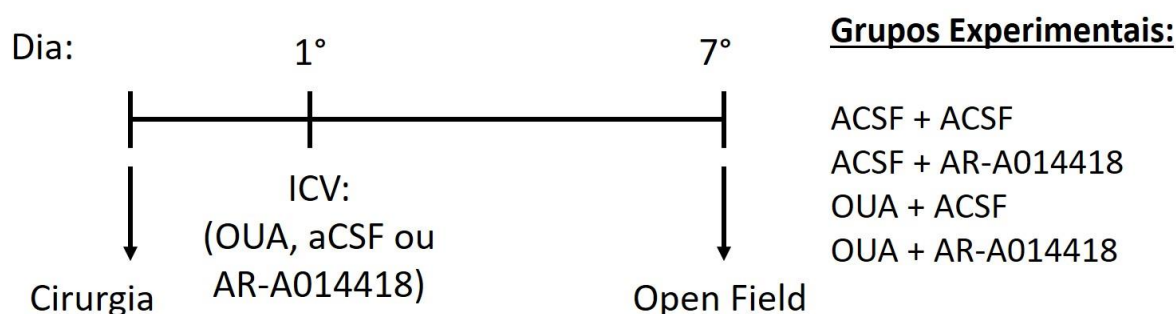


Figura 5: Desenho experimental I. Foi realizada a cirurgia estereotáxica para a implantação da cânula no ventrículo lateral dos animais. Após 72h, os animais receberam OUA, AR-A014418 ou ACSF via ICV. Sete dias após o ICV, os animais foram submetidos ao teste do Campo Aberto. Logo após o teste comportamental, foram submetidos à decapitação por guilhotina.

3.2.4 Teste do Campo Aberto

Sete dias após a administração ICV, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto a fim de avaliar a atividade locomotora. O aparelho para a realização deste teste comportamental consistiu em uma caixa com 60x60 cm de comprimento e 50 cm de altura, com as paredes laterais e do fundo em madeira, a parede da frente de vidro transparente, e o chão em madeira (dividido por linhas pretas formando nove quadrantes), com uma lâmina de vidro por cima, sem cobertura no teto. Os animais foram colocados na sala de realização do teste 30 minutos antes do início, para habituação com o local.

O teste consistiu em colocar o animal dentro da caixa, no canto superior direito, permanecendo no aparelho durante 5 minutos. Neste teste foi avaliado: 1) o número de vezes em que o animal cruzou cada quadrante com as quatro patas (*crossing*, parâmetro utilizado para avaliar atividade locomotora); 2) o número de vezes que o animal suspendeu o corpo sobre as patas traseiras (*rearings*, parâmetro utilizado para avaliar atividade exploratória); 3) número de vezes que o animal cruzou o quadrante central do aparato (visitas ao centro, parâmetro utilizado para avaliar comportamento de risco); 4) o número de vezes que o animal apresentou comportamento de limpeza do corpo (*grooming*, parâmetro utilizado para avaliar comportamento estereotípico) e; 5) o número de vezes que o animal apresentou comportamento de esfregar as vibrissas com as patas dianteiras (*sniffing*, parâmetro utilizado também para avaliar comportamento estereotípico). Foi realizada a limpeza do aparato entre um animal e outro, utilizando com álcool 10%.

3.2.5 Amostras Cerebrais

Imediatamente após o teste do campo aberto, os animais foram submetidos à decapitação por guilhotina. O cérebro dos animais foi retirado e dissecado em córtex frontal e hipocampo, resfriados com nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados a -80°C . As amostras foram homogeneizadas com KCl KH_2PO_4 (12 mM KCl, 0.038 mM KH_2PO_4 , pH = 7.4).

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL II – EXPERIMENTO CLÍNICO

3.3.1 Aspectos Éticos

As entrevistas ou coletas de amostra de sangue periférico foram realizadas somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (apêndice A). O pesquisador se compromete a publicar os resultados do presente estudo.

3.3.2 Amostra

O cálculo do tamanho mínimo da amostra foi realizado com base na fórmula descrita por Medronho (2008):

$$n_0 = \frac{z_{\frac{\alpha}{2}}^2 \times P \times (1 - P)}{\varepsilon^2}$$

Em que z refere-se à estatística normal padronizada atrelada ao valor de α (0,05); P trata-se da proporção que maximiza o tamanho da amostra (0,5); ε refere-se ao erro amostral máximo tolerável (0,05); e n_0 é o tamanho inicial da amostra.

Em seguida o valor obtido inicialmente foi corrigido utilizando a fórmula descrita por Barbetta (2007):

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Onde N refere-se ao tamanho da população e n trata-se do tamanho mínimo da amostra a ser investigada. Foram avaliados um total de 82 pacientes, sendo 46 do grupo controle e 36 pacientes bipolares.

3.3.3 Local de Execução

As triagens, aplicação das escalas e retirada de sangue foram realizadas nas Clínicas Integradas da UNESC, no Ambulatório de Pesquisa de Transtorno Bipolar. O armazenamento das amostras de sangue e posteriores análises foram realizados no Laboratório de Psiquiatria Translacional da UNESC.

3.3.4 Triagem

Após a assinatura do TCLE, a confirmação do diagnóstico foi realizada através da Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do Eixo I do DSM-IV (SCID-I), aplicada por um avaliador treinado. Os pacientes foram recrutados a partir do Ambulatório de Psiquiatria das Clínicas Integradas da UNESC. Também foram verificados os prontuários da respectiva clínica. A duração prevista para do estudo ficou condicionada a inclusão do número de pacientes. Após a triagem, amostras de sangue foram coletadas por venopunção da região ante cubital para as análises bioquímicas propostas.

3.3.4.1 Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV Transtornos do Eixo I - SCID – I

Trata-se de uma Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID-IV), traduzida e adaptada para o português por Cristina Marta Del Bem, Antônio Waldo Zuardi, José Antônio Alves Vilela e José Alexandre de Souza Crippa que se caracterizam como um instrumento utilizado para a elaboração de diagnósticos clínicos psiquiátricos fundamentados no DSM-IV. A SCID é dividida em módulos que obedecem às categorias diagnósticas maiores. Os critérios diagnósticos estão presentes no próprio corpo do instrumento, promovendo a elaboração do diagnóstico conforme a entrevista progride (Del-Bem, 2001).

3.3.4.2 Escala Young para mania

A Escala Young de Mania do inglês Young Mania Rating Scale (YMRS) é uma das escalas de avaliação mais utilizadas para avaliar sintomas maníacos. A escala tem 11 itens e é baseado no relato subjetivo do paciente de sua condição clínica nos últimos 48 horas. Informação adicional baseia-se em observações clínicas efetuadas durante o decurso da

entrevista clínica. Os itens são selecionados com base em descrições publicadas dos principais sintomas de mania (Beigel et al., 1971; Vilela et al., 2005).

3.3.4.3 Escala de Hamilton para Depressão

Foi desenvolvida e elaborada por Hamilton no final da década de 50, atualmente é utilizado no mundo todo e é considerada “padrão ouro” na avaliação da depressão. Possui 21 itens com perguntas relacionadas a humor, sentimentos, suicídio, insônia, sintomas, trabalhos e atividades, sendo mensuradas em escores (Neto et al., 2001).

3.3.5 Critérios de Inclusão

- (a) Ser acometido pelo Transtorno Bipolar do Humor Tipo I, II com episódio atual maníaco, misto, depressivo ou eutímico (Pacientes);
- (b) Nenhum diagnóstico psiquiátrico de Eixo-I atual de acordo com o SCID-I (Controles);
- (c) Idade a partir de 18 anos;
- (d) Capacidade de entender e fornecer TCLE;
- (e) Coletar a amostra de sangue periférico;
- (f) Não estar em uso atual de psicofármaco e/ou substância psicoativa (Controles).

3.3.6 Critérios de Exclusão

- (a) Negar-se em fornecer o TCLE;
- (b) Não conseguir se comunicar;
- (c) Acidente vascular cerebral prévio;
- (d) Problemas respiratório crônico;

3.3.7 Eventos Adversos

Os riscos mais comuns são relacionados à venopunção: hipotensão, sonolência, tontura e formação de área de equimose e hematoma no local. Os eventos adversos foram monitorados através da medida da pressão arterial e entrevista clínica, e todos os dados foram registrados nos documentos da pesquisa, podendo ocorrer outros riscos, tais como reações emocionais quanto à aplicação das escalas. Entretanto, esses eventos adversos não ocorreram,

não sendo necessário realizar acolhimento nem encaminhamento, apesar de estarem disponíveis (Apêndice B).

Os benefícios se referem às elucidações dos mecanismos fisiopatológicos do TB, pois isso é de extrema importância para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e medicamentos a serem utilizados pelos pacientes.

3.3.8 Registro e Armazenamento de Dados

Os dados foram armazenados no Laboratório de Psiquiatria Translacional da UNESC, em armários chaveados com acesso somente aos pesquisadores diretamente ligados ao projeto.

3.3.9 Término do Estudo

Após a coleta da amostra de sangue periférico, os pacientes foram reencaminhados ao local de tratamento de origem (ambulatório de psiquiatria da UNESC). Os resultados serão publicados em forma de artigo científico.

3.3.10 Protocolo para isolamento de linfócitos

Neste protocolo, foram utilizados linfócitos de pacientes com TB e controles para o preparo das culturas. Amostra de sangue periférico num volume de 10 ml foram coletadas dos pacientes e controles, por venopunção da região ante cubital do braço direito ou esquerdo. O sangue foi coletado pela manhã (entre 8h e 10h) e os pacientes estavam em jejum. As amostras foram homogeneizadas em tampão correspondente à técnica a ser utilizada e armazenadas a -80° C. A proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando albumina sérica bovina como padrão. Este desenho experimental contou com 02 grupos experimentais: Controle e Pacientes com TB

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram isoladas usando centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado solução tampão de fosfato (PBS) na suspensão de CMSP resultante, contendo principalmente linfócitos, e centrifugado a 1300 rotações por minuto (RPM) por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensão em PBS (este procedimento foi repetido duas vezes). Foi centrifugado a 1200 RPM por 5

minutos e o sobrenadante foi removido e o pellet foi alocado em -80 ° C para análise posterior (Boyum, 1976).

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os desenhos experimentais I e II utilizaram as mesmas técnicas para as análises bioquímicas de 4-HNE e 8-ISO. As técnicas de isolamento mitocondrial, produção de superóxido em partículas submitocondriais, LPH, carbonilação de proteínas, 3-nitrotirosina e atividade das enzimas antioxidantes são exclusivas do desenho experimental I. Já a atividade de GSK-3, é exclusiva do desenho experimental II.

3.4.1 Isolamento mitocondrial

Os homogenatos de cérebro dos animais foram centrifugados a 700 g durante 10 min para eliminar núcleos e detritos celulares, e o sedimento foi lavado para enriquecer o sobrenadante, que foi centrifugado a 7000 g durante 10 min. O sedimento obtido, lavado e suspenso novamente no mesmo tampão, foi considerado como consistindo principalmente de mitocôndrias intactas capazes de realizar a fosforilação oxidativa. As os procedimentos foram realizados a 0-2 ° C. As partículas submitocondriais (PSM) foram obtidas por congelamento e descongelamento (três vezes) de mitocôndrias isoladas. Para as medições da produção de superóxido, as PSM foram lavadas duas vezes com 140 mM de KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) e suspensas no mesmo meio (Boveris et al., 1972).

3.4.2 Produção de superóxido em partículas submitocondriais

A produção de superóxido foi determinada em PSM de cérebros homogeneizados utilizando um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação de epinefrina dependente de superóxido ao adrenocromo a 37 (λ 480 nm = 4,0 mM⁻¹ cm⁻¹). O meio reacional consistiu em 0,23 M de manitol, 0,07 M de sacarose, 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), SMP (0,3-1,0 mg de proteína/ml), 0,1 m de CAT e 1 mM de epinefrina. NADH (50 μ M) e succinato (7 mM) foram usados como substratos e rotenona (1 μ M) e antimicina (1 μ M) foram adicionados como inibidores específicos, respectivamente, para avaliar a produção de O₂⁻ na NADH desidrogenase e na região b de ubiquinona-citocromo. A SOD foi utilizada na concentração final de 0,1-0,3 μ M para dar especificidade ao ensaio (Boveris, 1984).

3.4.3 Mensuração de peroxidação lipídica

Foi utilizado kit commercial para avaliação de 4-HNE (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, EUA; STA-338) e de 8-ISO (Cayman; Item No. 516351) seguindo as instruções do fabricante. 4-HNE: Adutos proteicos de 4-HNE formados por modificações em lisina, histidina, ou cisteína foram quantificados através de um kit ELISA sanduíche, utilizando um ensaio imunoenzimático, de acordo com Kimura et al. (2005). 8-ISO: 8-ISO foi quantificado usando um kit para ELISA do tipo competitivo. Este teste é baseado na competição entre 8-ISO (analito) e 8-ISO-acetilcolinesterase (8-ISO-AChE) conjugado (analito marcado), por um número limitado de sítios de união (antissoro específico para 8-ISO). Como o 8-ISO e o 8-ISO-AChE competem por um número limitado de ligação ao antissoro, a intensidade da cor induzida pela ligação do analito marcado é inversamente proporcional à quantidade de 8-ISO. Por isso, foi realizado um ajuste da curva através de um modelo logístico de quatro parâmetros para a determinação da concentração real de 8-ISO. O 8-ISO foi quantificado em pg/ml.

3.4.4 Hidroperóxido lipídico (LPH)

Para avaliação de LPH foi utilizado kit comercial (Cayman, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA, item No. 705003), e 8-ISO (Cayman; item No. 516351), seguindo instruções do fabricante. LPH: A LPH foi isolada a partir das amostras de tecido cerebral ou das culturas, utilizando uma solução de metanol com clorofórmio (0 °C, 1500g, 5min). Logo após, as amostras foram incubadas a 21°C com 0,1 unidades de mistura de cromogênio por unidade de extrato de clorofórmio. As amostras foram aplicadas em placas para a leitura pela absorbância de 500nm. A absorbância foi comparada com uma curva padrão de hidroperóxido para determinar a quantidade de peroxidação lipídica nas amostras. A LPH foi quantificada em nmol.

3.4.5 Carbonilação de proteínas

Carbonilação de proteínas: O dano oxidativo a proteínas foi analisado através da mensuração da quantidade de proteína carbonila presentes na amostra, através de um kit ELISA de imunodeteção (OxiSelect™ Protein Carbonil ELISA Kit - STA-310). A

quantidade de grupamentos carbonila presentes na amostra foi determinada pela comparação da absorbância, a 450 nm, da amostra com a de uma curva padrão.

3.4.6 3-Nitrotirosina (3-nitro)

Nitração de proteínas: A nitração de proteínas foi analisada através de um kit ELISA (OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit, STA305, Cell Biolabs, Inc., San Diego, EUA), competitivo, para a quantificação de 3-nitrotirosina. Após uma breve incubação da amostra em uma placa, um anticorpo anti-nitrotirosina é adicionado, seguido por um anticorpo secundário conjugado com HRP. A quantidade de 3-nitrotirosina presente na amostra foi determinada pela comparação com uma curva padrão.

3.4.7 Atividade das enzimas antioxidantes

SOD: O método consiste na utilização de xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxidos, que reagem com cloreto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltrazolio (INT), que forma o corante formazan que é analisado em espectrofotômetro a 492nm a 37 °C. A inibição na produção do cromógeno é proporcional a atividade da SOD presente na amostra (Bannister e Calabrese, 1987).

CAT: A atividade é baseada na taxa de degradação de H₂O₂, avaliada espectrofotometricamente em 240nm a 25 °C. A atividade de CAT foi calculada em relação aos micromols de H₂O₂ consumidos por miligrama de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de 43.6M⁻¹ cm⁻¹ (Aebi, 1984).

GPx: A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, bem como de outros lipoperóxidos, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato para esta reação e produzindo glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutathiona redutase com o consumo de NADPH, que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (Wendel, 1981).

GR: A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado em 340 nm. A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Carlberg e Mannervik, 1985).

3.4.8 Atividade de GSK-3 em linfócitos de pacientes com TB

Foram quantificadas GSK-3 β total e GSK-3 β fosforilada com serina 9 em CMSPs isolados por Enzyme Immunometric Assay (EIA) (TiterZyme EIA - Assay Designs, Inc, MI, USA), de acordo com o procedimento do fabricante. A atividade de GSK-3 β em CMSPs foi avaliada diretamente como os níveis de serina-9 (ser-9) GSK-3 β fosforilada (pGSK-3 β) e indiretamente, como a razão entre ser-9-pGSK-3 β e o conteúdo total de GSK-3 β em CMSPs (ser-9-pGSK-3 β / GSK-3 β total). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os resultados com animais, foi utilizado o programa *Statistica 7*® para os cálculos, e para a construção dos gráficos foi utilizado o programa *Graphpad Prism 5*®. Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. Diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey. As correlações foram analisadas utilizando o teste de Pearson. O coeficiente de Pearson é utilizado para analisar a força da relação entre variáveis contínuas.

Para resultados dos pacientes, os dados foram analisados por meio do software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA). A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Idade, escolaridade, escores da HDRS e YMRS foram avaliados usando o teste de Mann-Whitney para identificar as diferenças entre os grupos. As variáveis sexo e tabagismo foram avaliadas por meio do teste qui-quadrado de Pearson. Para analisar a atividade da GSK-3 foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para analisar os níveis de 4-HNE e 8-ISO foi utilizado o teste T de Student independente dos grupos. As correlações foram analisadas utilizando o teste de Spearman. O coeficiente de Spearman avalia força da relação entre variáveis não-paramétricas. Foram considerados significativos valores de $P \leq 0.05$ para animais e pacientes.

4 RESULTADOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL I

A figura 6 mostra os efeitos do tratamento com AR-A014418 sobre o comportamento do tipo maníaco induzido pela administração ICV de OUA. É possível observar que a OUA aumentou a atividade locomotora e exploratória (6a), comportamento de risco (6b), e comportamentos estereotipados, observados através do tempo de autolimpeza e tempo de limpeza das vibrissas (6c), quando comparados ao grupo controle. Já o tratamento com AR-A014418 reverteu as alterações comportamentais induzidas pela OUA. É importante ressaltar que o AR-A014418 *per se* não alterou o comportamento dos animais, indicando que os efeitos do inibidor de GSK-3 β não estão associados com sedação.

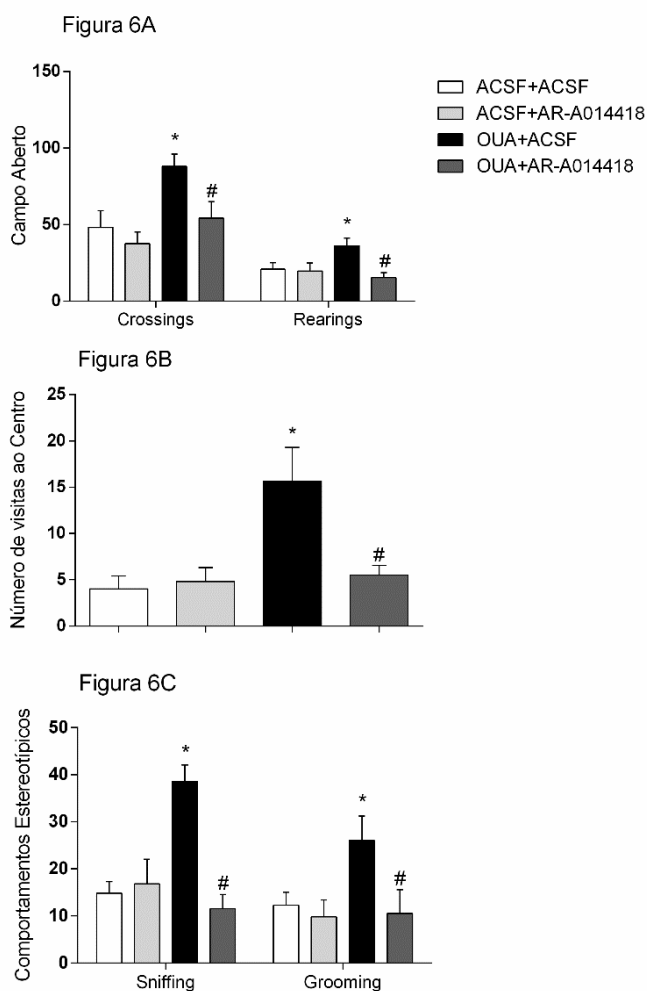


Figura 6: Efeitos da administração do AR-A014418 sobre o número de cruzamentos e levantamentos (a) visitar ao centro (b) e tempo de autolimpeza e limpeza das vibrissas (c) de animais submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n=10 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo ACSF. # $p \leq 0.05$ comparado ao grupo OUA.

Dados com ANOVA de duas vias revelaram os efeitos significativos da administração ICV de OUA [Crossing: $F(1.20) = 53.11$, $p < 0.001$; Rearing: $F(1.20) = 9.02$, $p = 0.007$; Risk-taking: $F(1.20) = 49.78$, $p < 0.001$; Grooming: $F(1.20) = 16.85$, $p < 0.001$; Sniffing: $F(1.20) = 36.18$, $p < 0.001$], do tratamento [Crossing: $F(1.20) = 32.94$, $p < 0.001$; Rearing: $F(1.20) = 35.56$, $p < 0.001$; Risk-taking: $F(1.20) = 28.50$, $p < 0.001$; Grooming: $F(1.20) = 26.58$, $p < 0.001$; Sniffing: $F(1.20) = 67.28$, $p < 0.001$] e interação significativa entre OUA e tratamento [Crossing: $F(1.20) = 8.92$, $p = 0.007$; Rearing: $F(1.20) = 27.52$, $p < 0.001$; Risk-taking: $F(1.20) = 39.60$, $p < 0.001$; Grooming: $F(1.20) = 13.86$, $p = 0.001$; Sniffing: $F(1.20) = 90.53$, $p < 0.001$].

A figura 7 mostra os efeitos da OUA e do tratamento com AR-A014418 sobre a produção de superóxido em partículas submitocondriais no córtex frontal e no hipocampo dos ratos. A OUA aumentou a produção de superóxido em ambas as estruturas avaliadas. Além disso, o tratamento com AR-A014418 reverteu o aumento na produção de superóxido em partículas submitocondriais induzido pela OUA no córtex frontal e no hipocampo dos animais.

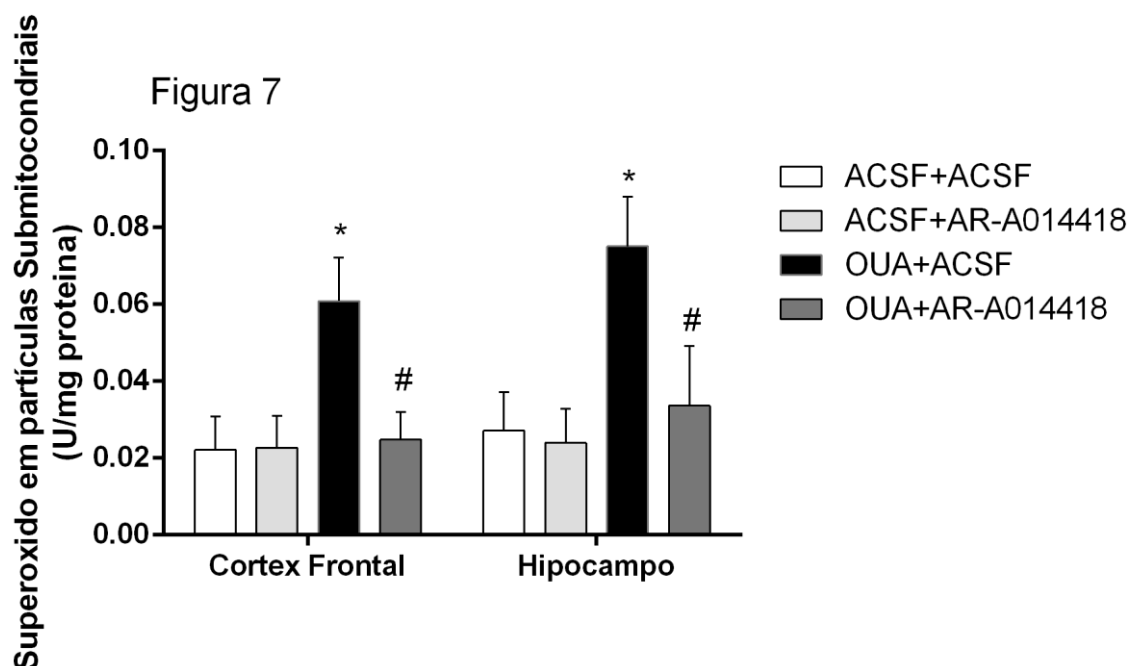


Figura 7: Efeitos da administração do AR-A014418 sobre a produção de superóxido em partículas submitocondriais no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA ($n = 6$ por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo ACSF. # $p \leq 0.05$ comparado ao grupo OUA.

Dados com ANOVA de duas vias revelaram os efeitos significativos da administração ICV de OUA [córtex frontal: $F(1.20) = 30.90$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 33.82$, $p < 0.001$], tratamento [córtex frontal: $F(1.20) = 23.28$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 20.33$, $p < 0.001$] e interação significativa entre OUA e tratamento [córtex frontal: $F(1.20) = 24.86$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 14.94$, $p < 0.001$].

Na figura 8 podem ser observados os efeitos da OUA sobre parâmetros de dano oxidativo a lipídeos através dos marcadores LPH (8A), 4-HNE (8B) e 8-ISO (8C) no córtex frontal e hipocampo dos ratos. A administração de OUA aumentou os níveis de todos os parâmetros avaliados em ambas as estruturas. O tratamento com AR-A014418 foi capaz de reverter o aumento de LPH induzido pela OUA em ambas as estruturas. Além disso, foi capaz de reverter os danos induzidos pela OUA nos níveis de 4-HNE no hipocampo, e reverteu parcialmente no córtex frontal. Já em relação aos danos nos níveis de 8-ISO, o tratamento com AR-A014418 somente exerceu efeitos significativos no córtex frontal, não sendo capaz de reverter essas alterações no hipocampo dos animais.

Dados com ANOVA de duas vias revelaram os efeitos significativos da administração ICV de OUA [LPH: córtex frontal: $F(1.20) = 17.03$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 11.73$, $p = 0.002$; 4-HNE: córtex frontal: $F(1.20) = 63.40$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 35.62$, $p < 0.001$; 8-ISO: córtex frontal: $F(1.20) = 92.33$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 34.85$, $p < 0.001$], tratamento [LPH: córtex frontal: $F(1.20) = 16.51$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 7.95$, $p = 0.01$; 4-HNE: córtex frontal: $F(1.20) = 10.84$, $p = 0.003$; hipocampo: $F(1.20) = 18.26$, $p < 0.001$; 8-ISO: córtex frontal: $F(1.20) = 84.96$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 15.40$, $p < 0.001$] e interação entre OUA e tratamento [LPH: córtex frontal: $F(1.20) = 19.58$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 6.37$, $p = 0.02$; 4-HNE: córtex frontal: $F(1.20) = 37.97$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 22.20$, $p < 0.001$; 8-ISO: córtex frontal: $F(1.20) = 85.39$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 8.59$, $p = 0.008$].

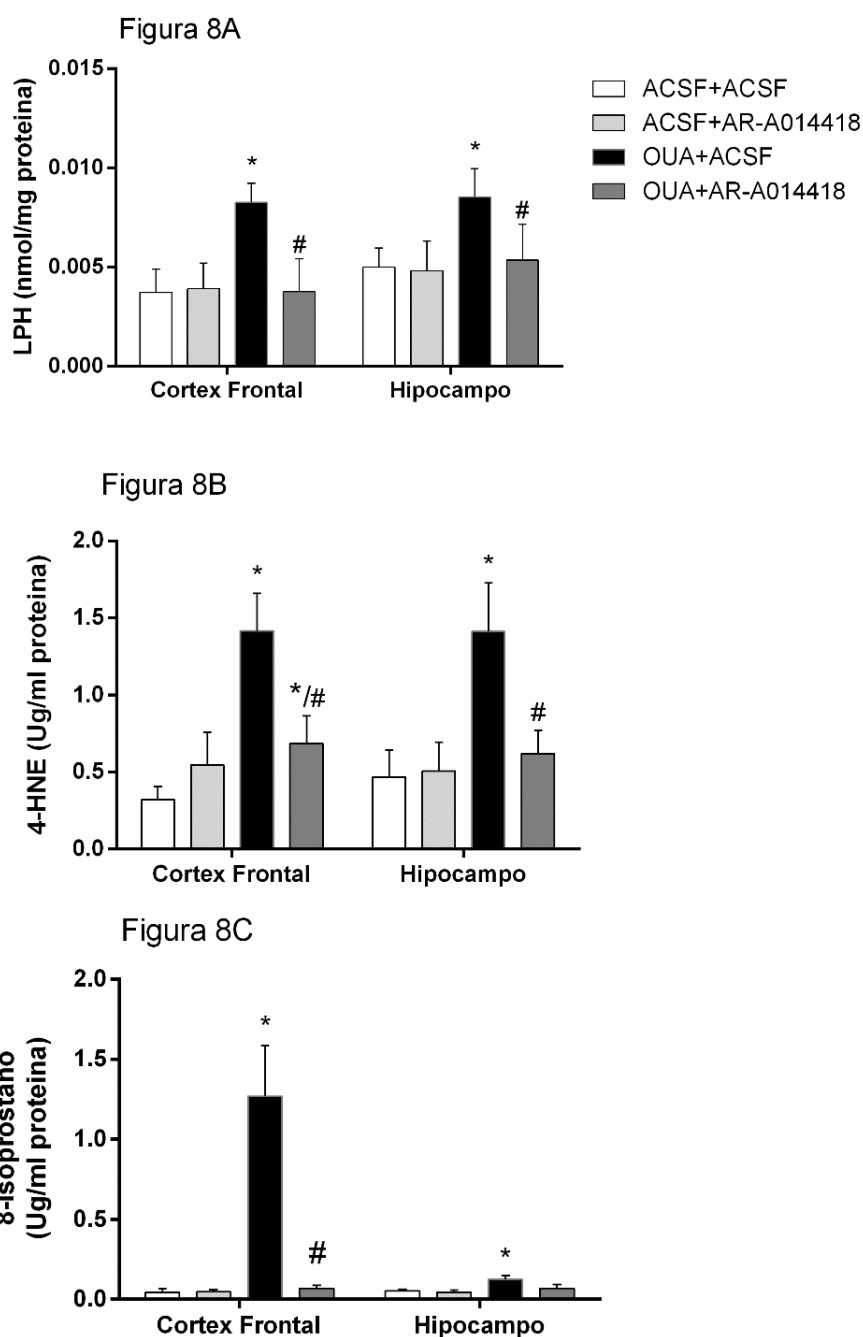


Figura 8: Efeitos da administração do AR-A014418 sobre os níveis de LPH (a), 4-HNE (b) e 8-ISO (c) no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n = 6 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo ACSF. # $p \leq 0.05$ comparado ao grupo OUA.

A figura 9 mostra um aumento significativo dos níveis de proteínas carboniladas (9a) e 3-nitrotirosina (9b) após administração de OUA no córtex frontal e no hipocampo dos animais. O tratamento com AR-A014418 reverteu essas alterações induzidas pela OUA em ambas as estruturas avaliadas.

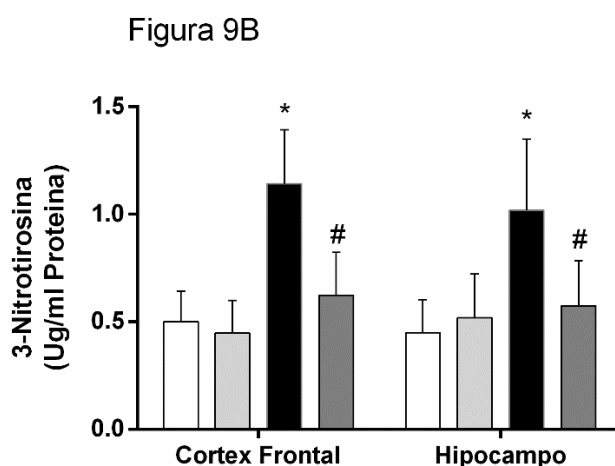
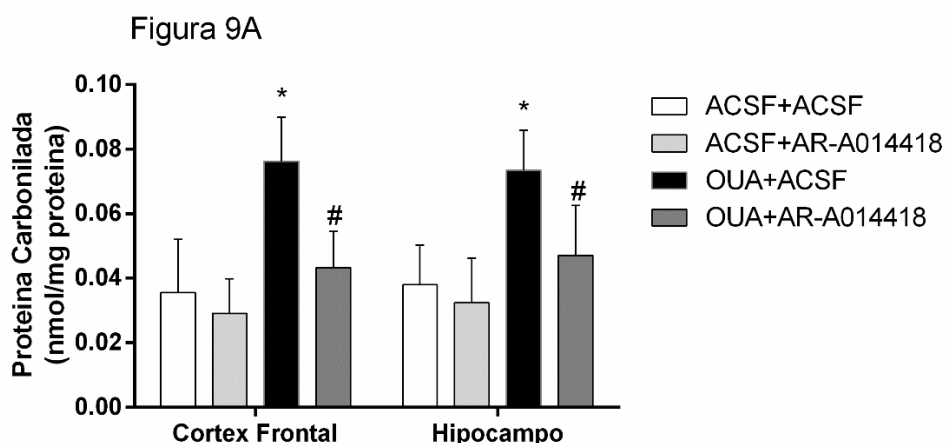


Figura 9: Efeitos da administração do AR-A014418 sobre os níveis de proteínas carboniladas (a) e 3-nitrotirosina (b) no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n = 6 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo ACSF. # $p \leq 0.05$ comparado ao grupo OUA.

Dados com ANOVA de duas vias revelaram os efeitos significativos da administração ICV de OUA [Carbonil: córtex frontal: $F(1,20) = 25.79$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1,20) = 20.51$, $p < 0.001$; 3-nitrotirosina: córtex frontal: $F(1,20) = 27.56$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1,20) = 10.68$, $p = 0.003$], tratamento [Carbonil: córtex frontal: $F(1,20) = 13.37$, $p = 0.001$; hipocampo: $F(1,20) = 8.36$, $p = 0.009$; 3-nitrotirosina: córtex frontal: $F(1,20) = 13.51$, $p = 0.001$; hipocampo: $F(1,20) = 3.84$, $p = 0.06$] e interação entre OUA e tratamento [Carbonil: córtex frontal: $F(1,20) = 5.99$, $p = 0.02$; hipocampo: $F(1,20) = 3.52$, $p = 0.07$; 3-nitrotirosina: córtex frontal: $F(1,20) = 8.89$, $p = 0.007$; hipocampo: $F(1,20) = 7.18$, $p = 0.014$].

As atividades das enzimas CAT e SOD são mostradas na figura 10. É possível observar que a administração de OUA provocou uma diminuição significativa na atividade da CAT no córtex frontal e no hipocampo dos animais (10a). Além disso, o tratamento com AR-A014418 reverteu essas alterações induzidas pela OUA em ambas as estruturas avaliadas. Em contrapartida, a administração de OUA aumentou a atividade de SOD no córtex frontal e no hipocampo dos ratos (10b). A administração do AR-A014418 não teve efeitos significativos sobre os efeitos da OUA sobre os níveis de SOD no córtex frontal, porém, reverteu parcialmente essa alteração no hipocampo.

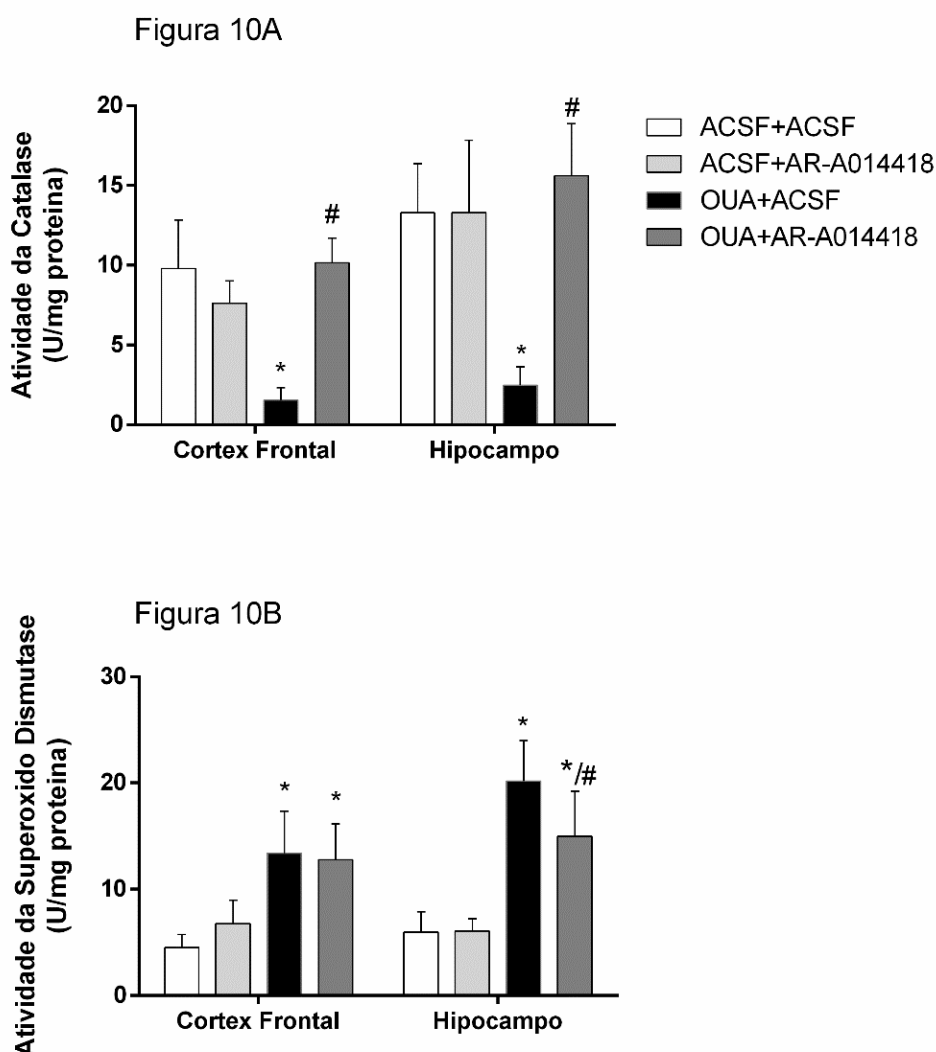


Figura 10: Efeitos da administração do AR-A014418 sobre os níveis de CAT (a) e SOD (b) no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n = 6 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo ACSF. # $p \leq 0.05$ comparado ao grupo OUA.

Dados com ANOVA de duas vias revelaram os efeitos significativos da administração ICV de OUA [CAT: córtex frontal: $F(1.20) = 13.94$, $p = 0,001$; hipocampo: $F(1.20) = 10.30$, $p = 0.004$; SOD: córtex frontal: $F(1.20) = 39.67$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 85.92$, $p < 0.001$], tratamento [CAT: córtex frontal: $F(1.20) = 17.51$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 24.51$, $p < 0.001$; SOD: córtex frontal: $F(1.20) = 0.48$, $p = 0.49$; hipocampo: $F(1.20) = 4.10$, $p = 0.06$] e interação entre OUA e tratamento [CAT: córtex frontal: $F(1.20) = 49.10$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 24.52$, $p < 0.001$; SOD: córtex frontal: $F(1.20) = 1.48$, $p = 0.23$; hipocampo: $F(1.20) = 4.47$, $p = 0.047$].

A figura 11 mostra os efeitos da OUA sobre a atividade da GPx (10a) e da GR (10b). A administração ICV de OUA aumentou a atividade de GPx e GR no córtex frontal e hipocampo dos ratos quando comparado ao grupo controle. O tratamento com AR-A014418 diminuiu essa alteração induzida pela OUA sobre a atividade de GPx no córtex frontal dos animais, mas não teve efeito no hipocampo. Além disso, a administração de AR-A014418 sobre as alterações da OUA sobre a atividade da GR em nenhuma das estruturas avaliadas.

Dados com ANOVA de duas vias revelaram os efeitos significativos da administração ICV de OUA [GPx: córtex frontal: $F(1.20) = 96.52$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 41.42$, $p = 0.001$; GR: córtex frontal: $F(1.20) = 57.95$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 32.85$, $p < 0.001$], tratamento [GPx: córtex frontal: $F(1.20) = 15.57$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 1.05$, $p = 0.3$; GR: córtex frontal: $F(1.20) = 1.09$, $p = 0.3$; hipocampo: $F(1.20) = 0.13$, $p = 0.7$] e interação entre OUA e tratamento [GPx: córtex frontal: $F(1.20) = 14.16$, $p = 0.001$; hipocampo: $F(1.20) = 0.00$, $p = 0.93$; GR: córtex frontal: $F(1.20) = 0.74$, $p = 0.39$; hipocampo: $F(1.20) = 1.78$, $p = 0.19$].

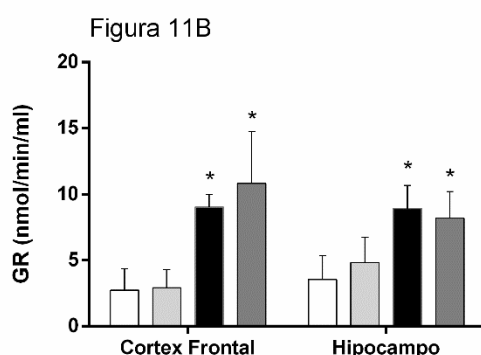
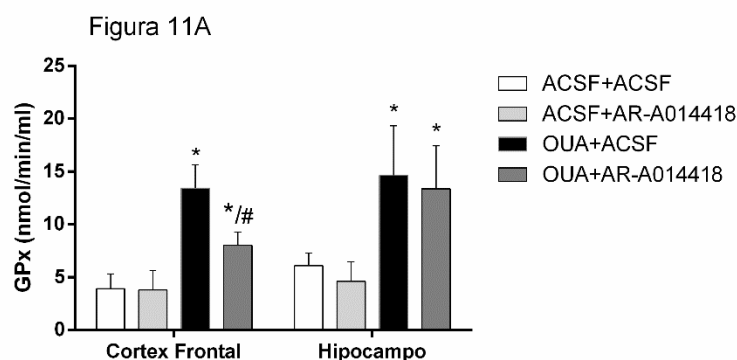


Figura 11: Efeitos da administração do AR-A014418 sobre os níveis de GPx (a) e GR (b) no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n = 6 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo ACSF. # $p \leq 0.05$ comparado ao grupo OUA.

A figura 12 mostra a correlação entre a atividade locomotora e a produção de superóxido em partículas submitocondriais (12a,b), e sobre os níveis de LPH (12c,d), 4-HNE (12e,f) e 8-ISO (12g,h) no córtex frontal e hipocampo dos ratos. A atividade locomotora apresentou uma correlação positiva com os parâmetros de dano oxidativo em ambas as estruturas avaliadas.

Dados da correlação de Pearson do número de cruzamentos x produção de superóxido em partículas submitocondriais são mostrados a seguir: [córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.6007$; $p < 0.0001$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.6148$; $p < 0.0001$)], LPH [córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.4707$; $p = 0.0002$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.4600$; $p = 0.0003$)], 4-HNE [córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.6294$; $p < 0.0001$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.6448$; $p < 0.0001$)], e 8-ISO [córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.6857$; $p < 0.0001$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.5578$; $p < 0.0001$)].

Figura 12

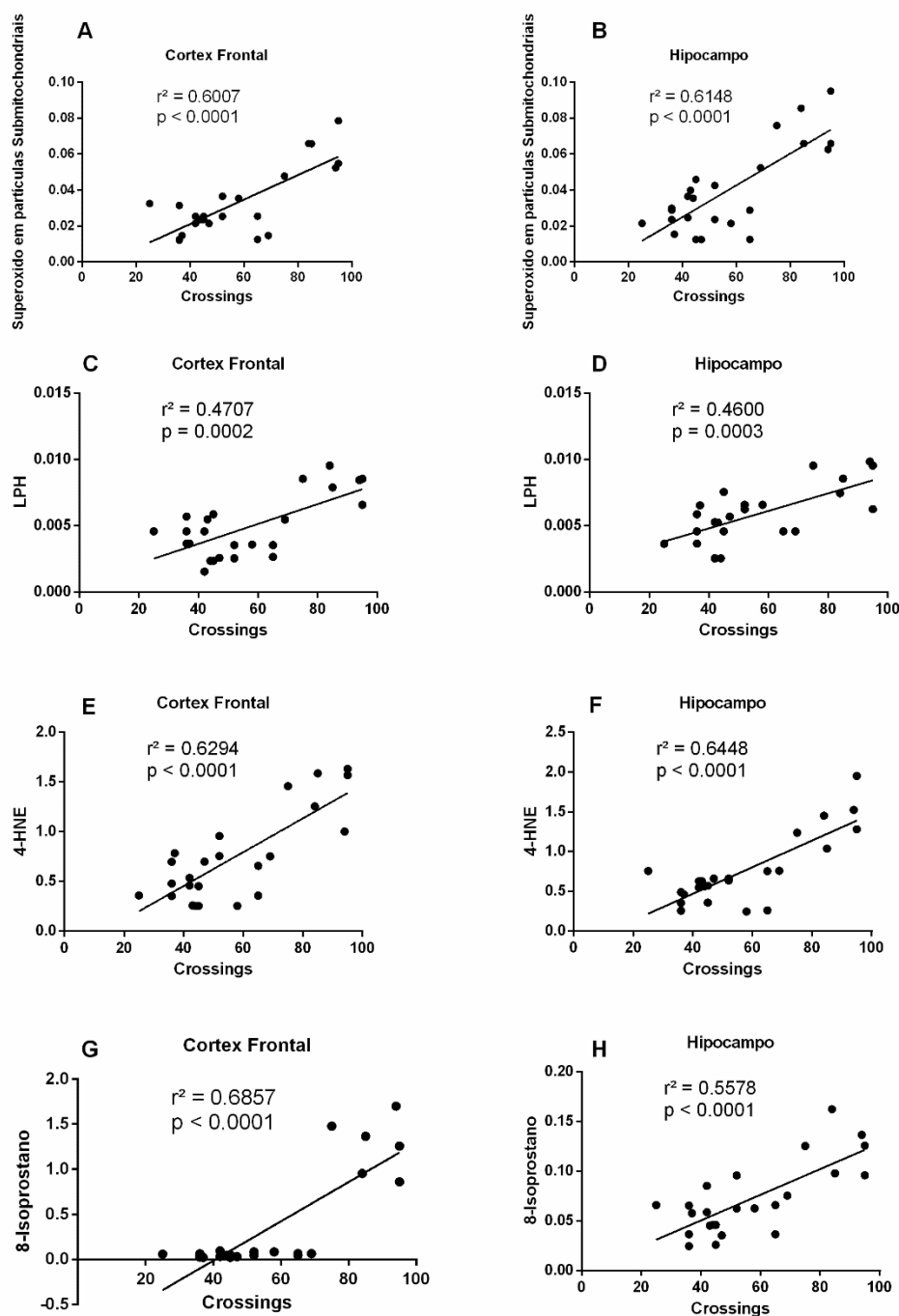


Figura 12: Correlação entre atividade locomotora (número de cruzamentos) e produção de superóxido em partículas submitocondriais no córtex frontal (a) e hipocampo (b); Correlação entre atividade locomotora (número de cruzamentos) e níveis de LPH no córtex frontal (c) e hipocampo (d); Correlação entre atividade locomotora (número de cruzamentos) e níveis de 4-HNE no córtex frontal (e) e hipocampo (f); Correlação entre atividade locomotora (número de cruzamentos) e níveis de 8-ISO no córtex frontal (g) e hipocampo (h) dos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. Resultados analisados utilizando teste de correlação de Pearson.

A figura 13 mostra a correlação entre a atividade locomotora e dano a proteínas, através dos níveis de carbonil (13a,b) e 3-nitrotirosina (13 c,d) no córtex frontal e hipocampo dos ratos. Os danos oxidativos e nitrosativos apresentaram uma correlação positiva com a atividade locomotora.

Figura 13

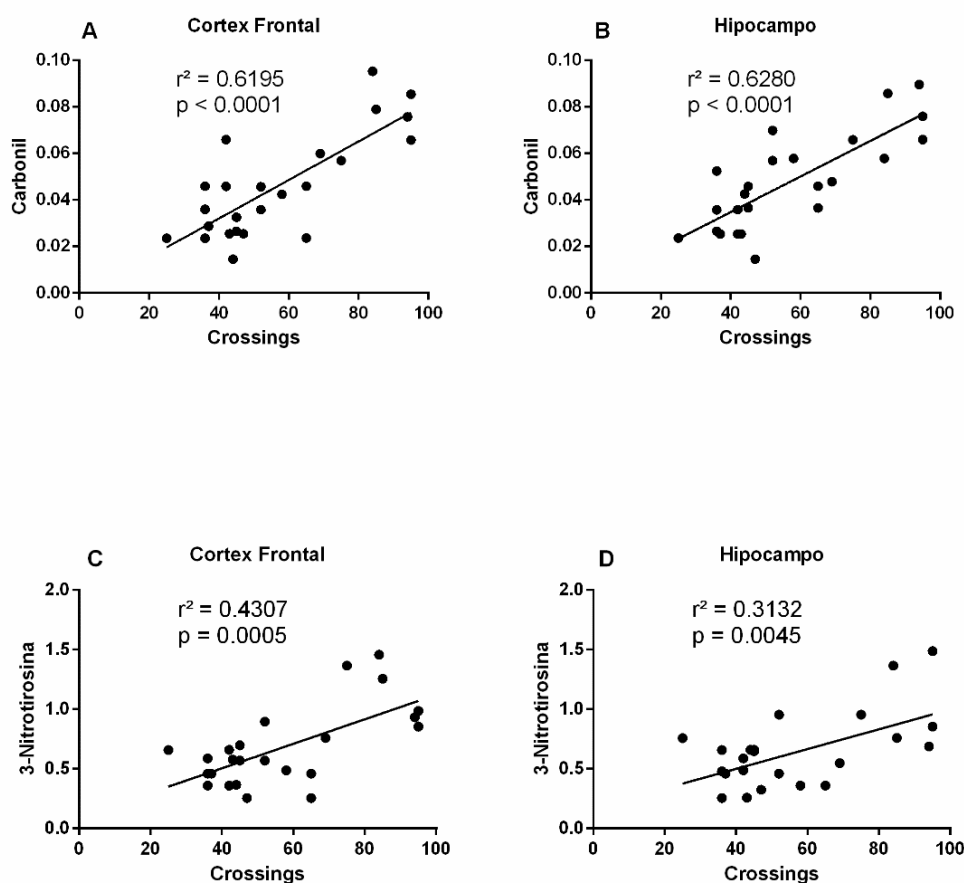


Figura 13: Correlação entre atividade locomotora (número de cruzamentos) e níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal (a) e hipocampo (b); Correlação entre atividade locomotora (número de cruzamentos) e níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal (c) e hipocampo (d) dos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. Resultados analisados utilizando teste de correlação de Pearson.

Dados da correlação de Pearson do número de cruzamentos x níveis de proteínas carboniladas são mostrados a seguir: [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.6195$; $p < 0.0001$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.6280$; $p < 0.0001$), e 3-nitrotirosina [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.4307$; $p = 0.0005$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.3132$; $p = 0.0045$)].

A correlação entre atividade locomotora e atividade das enzimas antioxidantes é apresentada na figura 14. É possível observar que a CAT foi negativamente correlacionada com a atividade locomotora no córtex frontal (14a) e no hipocampo (14b) dos animais.

Entretanto, a atividade das enzimas SOD (14c,d), GPx (14e,f) e GR (14g,h) foram positivamente correlacionadas com a atividade locomotora em ambas as estruturas avaliadas.

Figura 14

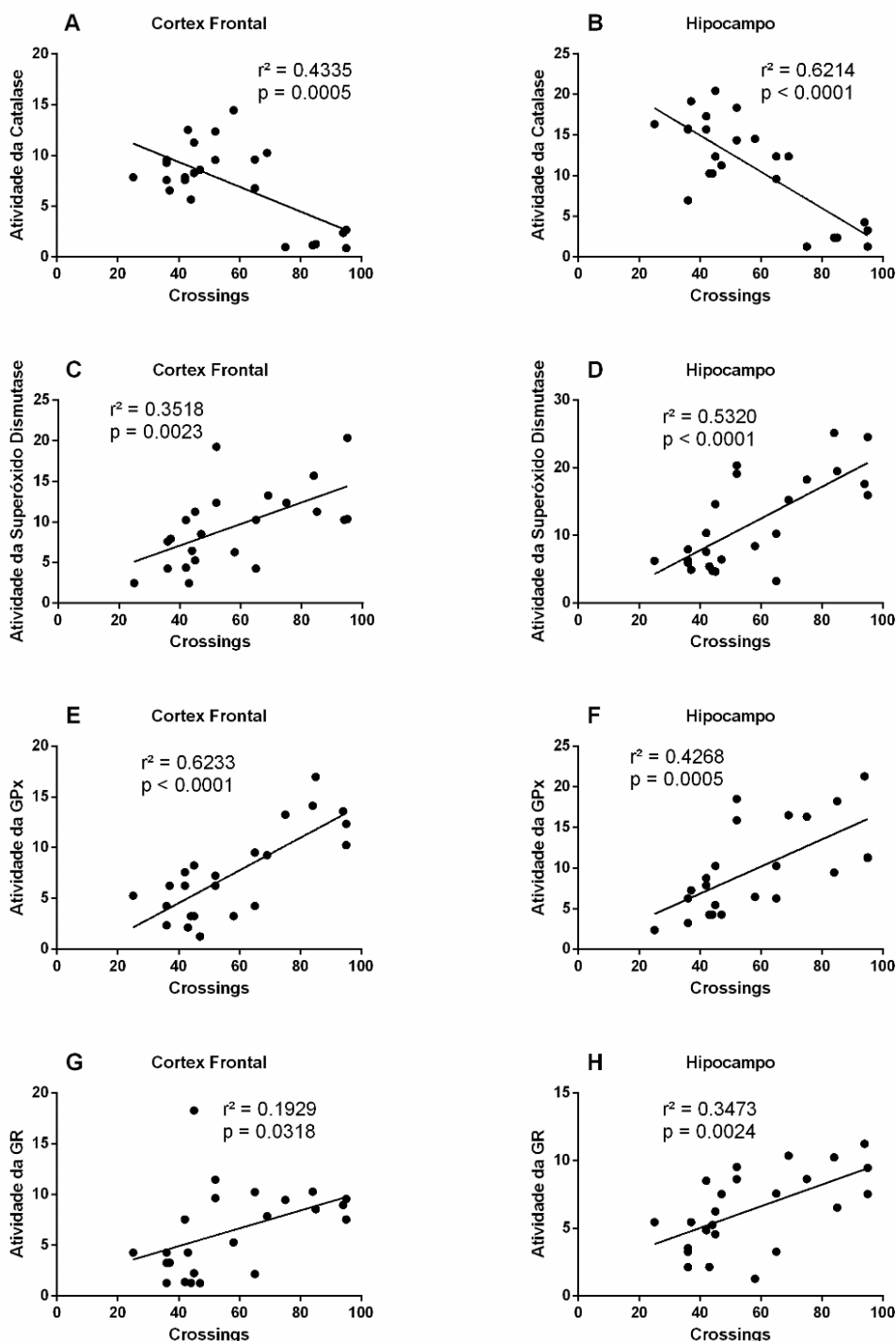


Figura 14: Correlação entre atividade locomotora (número de cruzamentos) e atividade das enzimas antioxidantes no córtex frontal e hipocampo dos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA: CAT (a,b), SOD (c,d), GPx (e,f) e GR (g,h). Resultados analisados utilizando teste de correlação de Pearson.

Dados da correlação de Pearson do número de cruzamentos x atividade de CAT: [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.4335$; $p = 0.0005$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.6214$; $p < 0.0001$)], SOD [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.3518$; $p = 0.0023$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.5320$; $p < 0.0001$)], GPx [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.6233$; $p < 0.0001$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.4268$; $p = 0.0005$)], GR [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.1929$; $p = 0.0318$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.3473$; $p < 0.0024$)].

A figura 15 mostra a correlação entre a produção de superóxido em partículas submitocondriais e dano oxidativo a lipídeos através dos níveis de LPH (15a,b) e dano oxidativo a proteínas através dos níveis de proteínas carboniladas (15c,d). O dano oxidativo a lipídeos e a proteínas foi positivamente correlacionado com a produção de superóxido em partículas submitocondriais.

Figura 15

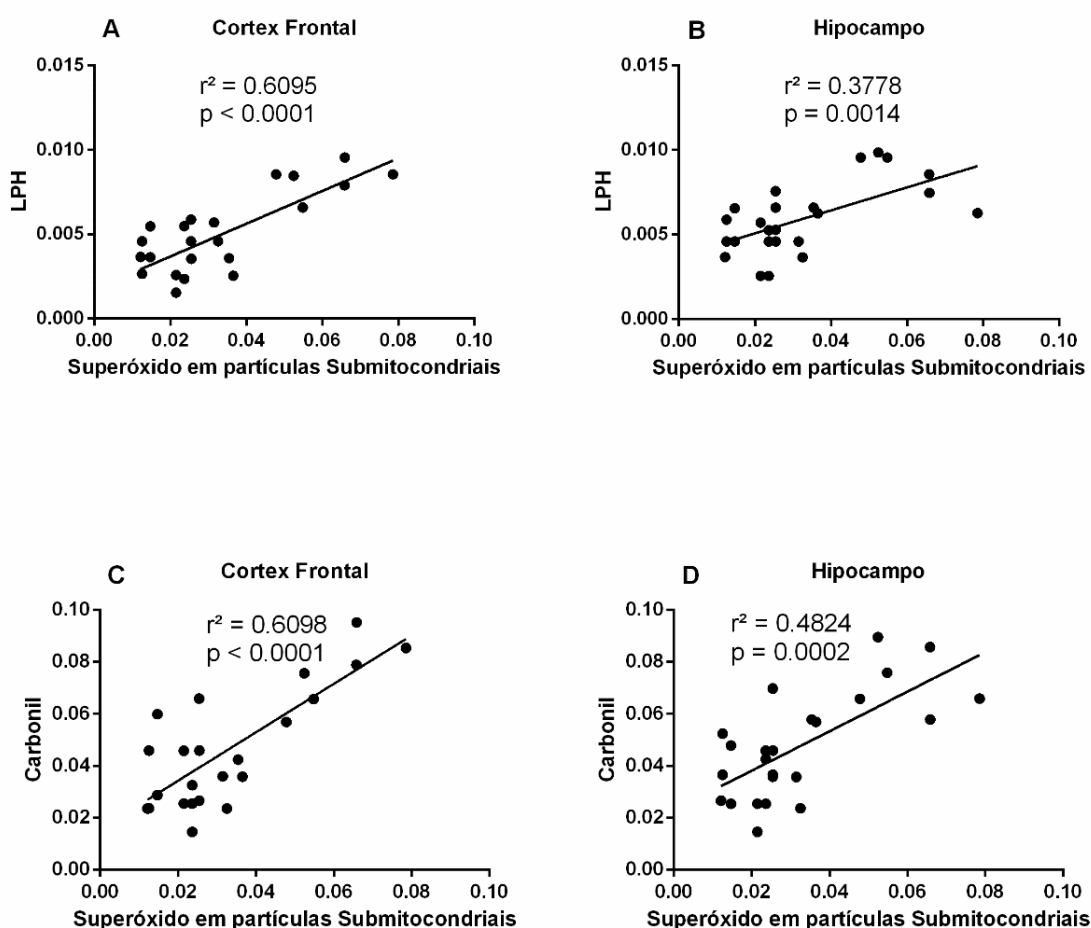


Figura 15: Correlação entre a produção de superóxido em partículas submitocondriais e níveis de LPH no córtex frontal (a) e hipocampo (b); Correlação entre a produção de superóxido em partículas submitocondriais e níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal (c) e hipocampo (d) dos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. Resultados analisados utilizando teste de correlação de Pearson.

Dados da correlação de Pearson entre níveis de LPH x produção de superóxido em partículas submitocondriais: [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.6095$; $p < 0.0001$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.3778$; $p = 0.0014$)], níveis proteínas carboniladas [córtex frontal ($n = 24$; $r^2 = 0.6098$; $p < 0.0001$), hipocampo ($n = 24$; $r^2 = 0.4024$; $p = 0.0002$)].

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL II

A tabela 1 mostra as características encontradas nos participantes da pesquisa. Após a triagem as entrevistas, considerando os critérios de inclusão e exclusão, no total, foram utilizados 82 participantes, sendo 46 no grupo controle e 36 pacientes. O grupo controle se dividiu em 36 do sexo feminino e 10 do sexo masculino, apresentando uma média de idade de 35 anos, com 15 anos de estudo, sendo 8 (17,4%) fumantes. Já o grupo composto pelos Pacientes com TB se dividiu em 29 do sexo feminino e 7 do sexo masculino, com uma média de idade de 45,5 anos, com 12,5 anos de estudo, sendo 11 (30,6%) fumantes. Além disso, dentre os Pacientes com TB, 3 se apresentavam características de um episódio de mania, 23 apresentaram características de um episódio depressivo, 3 apresentaram características mistas e 7 se encontravam em período eutímico. A média de idade para início do transtorno nos pacientes foi de 31,44 anos, os quais possuem o transtorno em um tempo médio de 12,5 anos.

A tabela 1 também mostra os dados referentes ao uso de medicação pelos Pacientes com TB que participaram da pesquisa. Pode-se observar que dentre os medicamentos mais utilizados pelos pacientes, encontravam-se o lítio (30,6%), o Clonazepam (27,8%) e a Quetiapina (22,2%). É importante ressaltar que normalmente o tratamento do TB pode envolver o uso simultâneo de diferentes medicamentos, portanto, o mesmo paciente pode estar fazendo o uso de mais de um medicamento. Alguns pacientes também relataram o uso de anticonvulsivantes, tais como Carbamazepina (13,9%), Ácido valpróico (8,3%) e Lamotrigina (13,9%). Já os pacientes que utilizavam antidepressivos, 8,3% relataram o uso de Bupropiona assim como a mesma porcentagem relatou o uso de Venlafaxina, enquanto 16,7% relataram o uso de Sertralina, 13,9% o uso de Citalopram, 13,9% Fluoxetina, 2,8% Imipramina e 2,8% Amitriptilina. Além disso, alguns pacientes relataram o uso de antipsicóticos. Foi relatado para os antipsicóticos atípicos, 11,1% do uso de Olanzapina, 22,2% de Quetiapina e 11,1% de Risperidona, enquanto no uso de antipsicóticos típicos, foi relatado o uso de Clorpromazina (8,3%) e Levomepromazina (2,8%). Também foi relatado o

uso de benzodiazepínicos, tais como Alprazolam (19,9%), Diazepam (8,3%) e Clonazepam (27,8%). E por fim, 2,8% dos pacientes relataram o uso de Biperideno.

Tabela 1 - Características das amostras

	Controles (n = 46)	Pacientes com TB (n = 36)	Valor de P
Idade (anos) mediana (IQR)	35 (44)	45.5 (42)	0.161 ^a
Escolaridade (anos), mediana (IQR)	15 (38)	12.5 (25)	0.069 ^a
Sexo (F/M)	(36/10)	(29/7)	0.799 ^b
Fumante n (%)	8 (17.4)	(11) 30.6	0.161 ^b
Hamilton, n (média ± SD)	46 (1.04 ± 2.24)	Eutímico: 7 (6.28 ± 4.64) Depressivo: 23 (19.82 ± 6.47) Maníaco: 3 (7.33 ± 5.13) Misto: 3 (17.67 ± 5.03)	
YMRS, n (média ± SD)	46 (0.22 ± 0.72)	Eutímico: 7 (2 ± 2.88) Depressivo: 23 (2.26 ± 2.88) Maníaco: 3 (9.33 ± 3.21) Misto: 3 (12.66 ± 4.5)	
Idade de início (anos), média ± SD		31.44 ± 11.18	
Duração da condição (anos), mediana (IQR)		12.5 (36)	
Uso de medicação n (%) Pacientes com TB			
Lítio	11 (30.6)		
Anticonvulsivantes		Carbamazepina: 5 (13.9) Ácido Valpróico: 3 (8.3) Lamotrigina: 5 (13.9)	
Antidepressivos		Bupropiona: 3 (8.3) Venlafaxina: 3 (8.3) Sertralina: 6 (16.7) Citalopram: 5 (13.9) Fluoxetina: 5 (13.9) Imipramina: 1 (2.8) Amitriptilina: 1 (2.8)	
Antipsicóticos atípicos		Olanzapina: 4 (11.1) Quetiapina: 8 (22.2) Risperidona: 4 (11.1)	
Antipsicóticos típicos		Clorpromazina: 3 (8.3) Levomepromazina: 1 (2.8)	
Benzodiazepínicos		Alprazolam: 5 (13.9) Diazepam: 3 (8.3) Clonazepam: 10 (27.8)	
Biperideno	1 (2.8)		
Metilfenidato	2 (5,6)		

Tabela 1: Características sociodemográficas dos pacientes, Scores das escalas de Hamilton e Young, e medicações usadas pelos pacientes.

A figura 16 mostrou a atividade da GSK-3 β nos pacientes com TB quando comparados ao grupo controle. É possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.

Figura 16

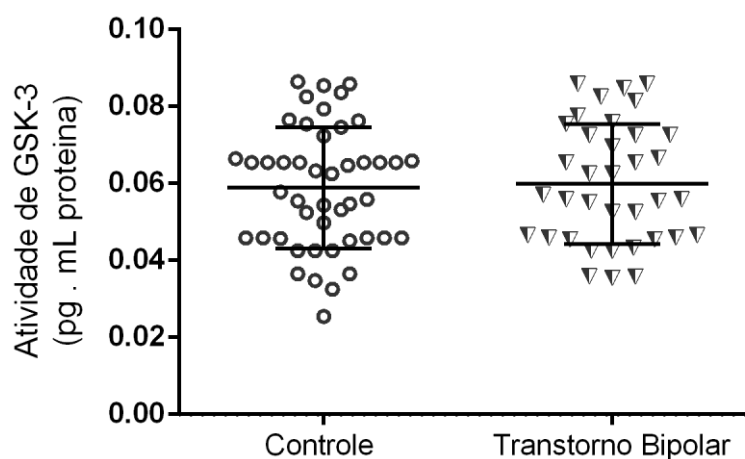


Figura 16: Atividade de GSK-3 β em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. Dados avaliados através do teste de Mann-Whitney.

Os níveis de 4-HNE em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis podem ser observados na figura 17. É possível observar que houve um aumento nos níveis de 4-HNE nos pacientes com TB quando comparados ao grupo controle.

Figura 17

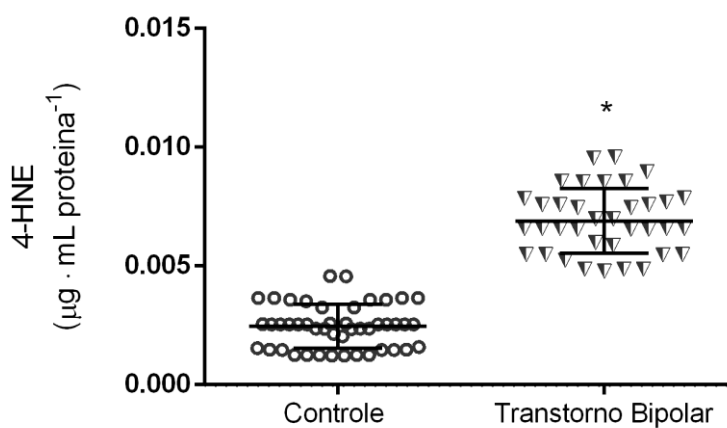


Figura 17: Níveis de 4-HNE em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. Dados avaliados através do teste de T de student. *p ≤ 0.05 comparado ao grupo controle.

Na figura 18 é possível observar os níveis de 8-ISO em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. Os pacientes com TB mostraram aumentos nos níveis de 8-ISO quando comparados ao grupo controle.

Figura 18

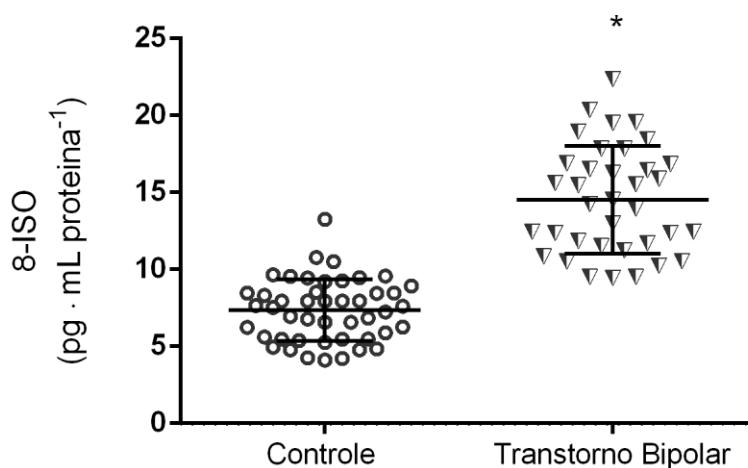


Figura 18: Níveis de 8-ISO em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. Dados avaliados através do teste de T de Student. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo controle.

A figura 19 mostra a correlação entre a atividade de GSK-3 β e os níveis de 4-HNE em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. Através da análise de correlação de Spearman, foi possível observar uma correlação negativa entre esses dois parâmetros. Dados da correlação de Spearman entre atividade de GSK-3 β x níveis de 4-HNE: $n = 72$; $r = 0.6374$; $p < 0.0001$.

É possível observar na figura 20 a correlação entre a atividade de GSK-3 β e os níveis de 8-ISO em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. É possível observar que, através da análise de correlação de Spearman, houve também uma correlação negativa entre esses dois parâmetros. Dados da correlação de Spearman entre atividade de GSK-3 β x níveis de 8-ISO: $n = 72$; $r = 0.6737$; $p < 0.0001$.

Figura 19

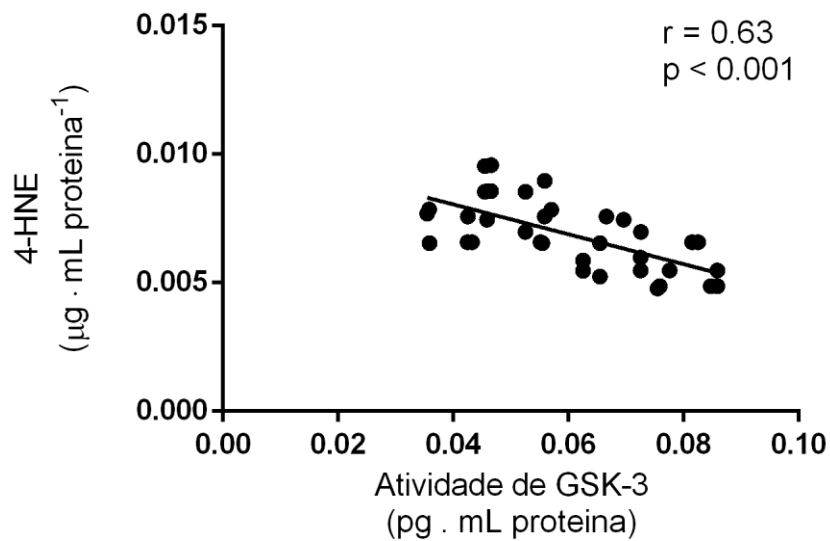


Figura 19: Correlação entre a atividade de GSK-3 β e níveis de 4-HNE em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. Dados avaliados através do teste de correlação de Spearman.

Figura 20

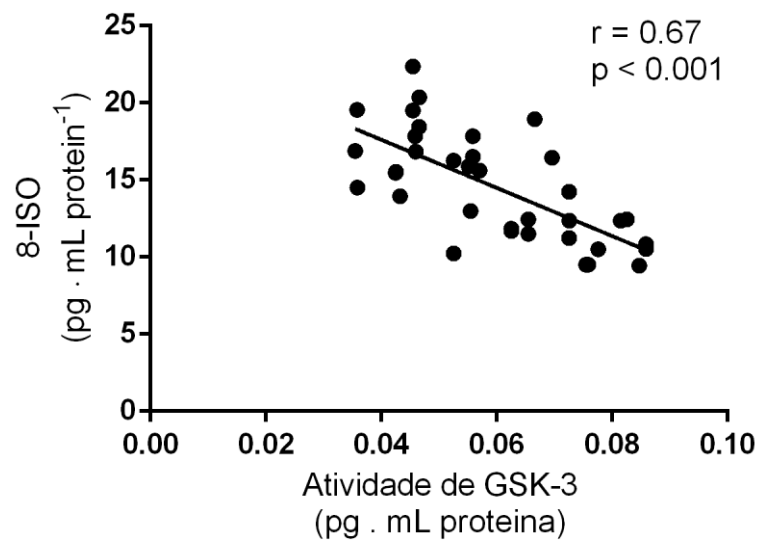


Figura 20: Correlação entre a atividade de GSK-3 β e níveis de 8-ISO em linfócitos de pacientes com TB e controles saudáveis. Dados avaliados através do teste de correlação de Spearman.

5 DISCUSSÃO

Estudos demonstraram a importância da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ na fisiopatologia do TB (Naylor 1980; Johnston et al., 1980; Reddy et al., 1992). A OUA, um inibidor da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, induz comportamento do tipo maníaco em ratos, e é considerado um bom modelo animal de mania. No presente estudo, o comportamento do tipo maníaco observado nos ratos foi através dos aumentos no número de cruzamentos e levantamentos (atividade locomotora e exploratória), comportamento de risco (visitas ao centro do campo aberto), e comportamentos estereotipados (autolimpeza e limpeza das vibrissas). Além disso, a administração do AR-A014418, um inibidor de GSK-3 β , reverteu essas alterações comportamentais induzidas pela OUA. Resultados semelhantes foram observados em um outro estudo de nosso grupo de pesquisa, o qual demonstrou que o AR-A014418 preveniu aumentos na atividade locomotora e exploratória de ratos wistar (Valvassori et al., 2017). Entretanto, o presente estudo é o primeiro a mostrar os efeitos do AR-A014418 sobre o comportamento de risco e comportamentos estereotipados em um modelo animal de mania induzido por OUA. No estudo anterior, foi sugerido que os efeitos da OUA são associados com a ativação da GSK-3 β e que o Li e o VPA exercem efeitos protetores sobre a OUA através da inibição de vias de GSK-3 β (Valvassori et al., 2017). Diversos estudos têm reportado o envolvimento da GSK-3 β em comportamentos do tipo maníaco induzidos por psicoestimulantes, tais como anfetamina (Chalecka-Franaszek e Chuang, 1999; Beaulieu et al., 2004; Xing et al., 2015). Um estudo anterior mostrou que o aumento da neurotransmissão dopaminérgica resulta em uma inativação da Akt, e concomitantemente a ativação de GSK-3 α e GSK-3 β . Além disso, inibições genéticas ou farmacológicas de GSK-3 reduzem significativamente comportamentos locomotores dependentes de dopamina (Beaulieu et al., 2004). Sui e colaboradores (2013) demonstraram, através de experimentos eletroquímicos, que a administração ICV de OUA aumenta a liberação de dopamina no cérebro de ratos. Portanto, a inibição de GSK-3 β , e consequente modulação do sistema dopaminérgico pode ser o mecanismo pelo qual o AR-A014418 está agindo sobre o comportamento do tipo maníaco observado no presente estudo. É importante enfatizar que o Li e o VPA, medicamentos padrão ouro no tratamento do TB, inibem GSK-3 β (Klein e Melton, 1996; Stambolic et al., 1996; Hong et al., 1997; Zarate et al., 2006; Maqbool et al., 2015). Juntos, esses estudos sugerem que a GSK-3 β é um importante alvo para o tratamento do TB.

No presente estudo, a administração de OUA aumentou os níveis de superóxido em partículas submitocondriais no córtex frontal e no hipocampo dos animais. Corroborando

com os presentes resultados, outros autores também mostraram que a OUA aumenta os níveis de superóxido em partículas submitocondriais (Riegel et al., 2009; Jornada et al., 2011; Valvassori et al., 2015). O aumento nos níveis de superóxido em partículas submitocondriais induzidos pela OUA podem explicar, ao menos em parte, o dano oxidativo induzido nos lipídeos e proteínas observados no presente estudo. Dentro disso, houve uma correlação positiva entre o dano oxidativo a lipídeos e proteínas com a produção de superóxido em partículas submitocondriais em ambas as estruturas avaliadas. Em acordo com esses resultados, estudos anteriores demonstraram que a OUA aumenta os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação de proteínas, marcadores de oxidação a lipídeos e proteínas (Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011). Esses resultados anteriores, em conjunto com o presente estudo, sugerem que produção de superóxido e dano a membrana mitocondrial induzidos pela OUA, afetam a célula por inteiro, podendo levar a dano tecidual.

O presente estudo mostrou que o tratamento com o inibidor de GSK-3 β , AR-A014418, diminuiu o aumento de superóxido em partículas submitocondriais induzido pela OUA. Portanto, pode sugerir que há uma relação entre alterações na Na⁺K⁺ATPase e dano mitocondrial, ambos observados em pacientes com TB. Além de ser encontrada no citosol, a GSK-3 β também está presente no núcleo celular e na mitocôndria (Hoshi et al., 1996; Diehl et al., 1998; Bijur e Jope, 2001). Yan e colaboradores (2015) demonstraram que a fosforilação de proteína relacionada a dinamina 1 (Drp1) em serina 40 e serina44, dependente de GSK-3 β , aumenta a atividade de Drp1 GTPase, induzindo fragmentação mitocondrial. No mesmo estudo, os autores mostraram que a inibição da GSK-3 β com AR-A014418 diminui a fragmentação mitocondrial no cérebro de ratos. É bem descrito na literatura que alterações mitocondriais têm um papel essencial em processos de estresse oxidativo (McBride et al., 2006; Rowlands, 2016). Portanto, pode-se sugerir que o AR-A014418 pode estar protegendo a mitocôndria e, conseqüentemente, diminuindo o aumento nos níveis de superóxido em partículas submitocondriais induzidos pela OUA.

O tratamento com AR-A014418 diminuiu os níveis de LPH e 4-HNE no córtex frontal e no hipocampo dos ratos, e os níveis de 8-ISO somente no córtex frontal. É bem descrito na literatura que Li e VPA, os quais são inibidores de GSK-3 β , também possuem propriedades antioxidantes (Li et al., 2016; Valvassori et al., 2017). Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com Li diminui os níveis de 8-ISO e 4-HNE no cérebro de animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por privação do sono (Valvassori et al., 2017). É importante ressaltar que o Li e o VPA possuem outros mecanismos de ação;

entretanto, pode-se sugerir que os efeitos antioxidantes desses medicamentos podem ser, ao menos em parte, através da inibição de GSK-3 β . Um estudo *in vitro* demonstrou que a inibição de GSK-3 β diminui o estresse oxidativo em células L02 de fígado submetidas ao dano oxidativo induzido por H₂O₂, levando a um aumento da sobrevivência celular (Xing et al., 2015). No presente estudo, a inibição de GSK-3 β , além de promover efeitos antimaníacos, também protegeu o cérebro contra o dano oxidativo a lipídeos. É importante enfatizar que, através da correlação de Pearson, foi demonstrada uma correlação positiva entre os níveis de superóxido, LPH, 4-HNE, 8-ISO, carbonilação de proteínas e 3-nitrotirosina com comportamento do tipo maníaco.

Pode-se observar que a OUA induz importantes alterações nos sistemas antioxidantes enzimáticos. A OUA diminuiu a atividade de CAT e aumentou a atividade de SOD, GPx e GR no córtex frontal e hipocampo dos ratos. No presente estudo, houve uma associação entre as alterações enzimáticas e comportamentos do tipo maníaco. Foi observada uma correlação negativa entre a atividade de CAT e o número de cruzamentos no teste do campo aberto; porém, houve uma correlação positiva entre a atividade de SOD, GPx, e GR com a atividade locomotora. Em acordo com os resultados do presente estudo, estudos anteriores demonstraram que a OUA diminuiu a atividade da CAT e aumentou a atividade de SOD no hipocampo e córtex frontal de animais submetidos a um modelo animal de mania (Jornada et al., 2011; Brüning et al., 2012; Souza et al., 2014). Ao contrário dos resultados observados no presente estudo, Souza et al. (2014) mostraram uma diminuição na atividade da GPx após a administração ICV de OUA. Entretanto, é importante observar que no estudo de Souza et al. (2014) os efeitos da administração de OUA foram avaliados imediatamente após o ICV, ao contrário do presente estudo, que avaliou os efeitos da OUA 7 dias após o ICV. Brüning e sua equipe (2012), assim como Brocardo e colaboradores (2010) também encontraram resultados diferentes do presente estudo, onde Brüning demonstrou que não houve alterações na atividade de GPx e GR após o ICV de OUA, e Brocardo mostrou que após o ICV de OUA a atividade de GPx e GR diminuíram. Porém, essas diferenças nos resultados podem ser explicadas por diferenças metodológicas, onde no presente estudo as análises foram feitas 7 dias após o ICV, e nos outros experimentos foram analisados logo após a administração ICV.

Sabe-se que a GPx e GR estão entre as principais enzimas antioxidantes, as quais estão diretamente envolvidas na neutralização das ERO. A GPx remove o H₂O₂, oxidando a GSH reduzida em GSSG (Valko et al., 2007; Andreazza et al., 2012; Birden et al., 2012). Já a SOD tem ação por transformar o ânion O₂⁻ em H₂O₂, e a CAT metaboliza o H₂O₂, produzindo

$O_2 + H_2O$, diminuindo o estado redox intracelular (Andreazza et al., 2008). No presente estudo, o aumento na atividade de SOD induzido pela OUA pode ser explicado pelo aumento na produção de superóxido mitocondrial e, conseqüentemente, aumentando a atividade de GPx. É importante salientar que a OUA aumentou a atividade de GR, que regenera GSH a partir de GSSG, com NADPH como fonte de poder redutor. Entretanto, foi demonstrado que a OUA diminuiu a atividade de CAT no córtex frontal e hipocampo dos animais. Apesar da OUA aumentar os níveis de SOD, GPx e GR, essas enzimas não foram capazes de reverter o dano oxidativo a lipídeos e a proteínas induzidos pela OUA. É importante observar que o AR-A014418 protegeu contra a diminuição na atividade de CAT induzida pela OUA, mas não alterou o aumento nas atividades de SOD, GPx e GR induzidos pela OUA. Portanto, pode-se sugerir que os efeitos antioxidantes do AR-A014418 sobre a OUA podem estar associados com a modulação da atividade de CAT no córtex frontal e hipocampo dos ratos. As enzimas antioxidantes parecem trabalhar em conjunto para reverter os danos oxidativos induzidos pela OUA.

Apesar do TB ter início entre a adolescência e início da vida adulta, o diagnóstico correto é difícil, demorado e necessita de acompanhamento. Além disso, é comum a ocorrência de erros de diagnóstico, onde o paciente bipolar é previamente diagnosticado com depressão unipolar. Dentre os pacientes com TB que buscam auxílio profissional durante um episódio depressivo, apenas 20% recebem um diagnóstico correto para TB (Goldberg et al., 2001; Hirschfeld, 2014; Grande et al., 2016). Também é descrito que pode haver um aparecimento tardio do transtorno em pacientes do sexo feminino (Leibenluft, 1996; Arnold, 2003; Guerra e Cali, 2005). Portanto, esses dados podem explicar, ao menos em parte, o aparecimento mais tardio do TB encontrado no presente estudo, levando em consideração a presença de um maior número de pacientes do sexo feminino na amostra. Além disso, também é descrito que os episódios depressivos são mais frequentes do que os episódios de mania em pacientes com TB. Também é descrito que pacientes do sexo feminino possuem episódios depressivos com uma maior frequência e maior duração do que pacientes do sexo masculino (Guerra e Cali, 2005; Silva et al., 2017) corroborando com o presente estudo, que apresentou um maior número de pacientes com características de depressão. Porém, deve-se levar em consideração o tamanho da amostra antes de obter conclusões mais precisas. Sendo assim, mais estudos são necessários para melhor observar a ocorrência, frequência e duração de cada episódio em ambos os sexos.

O tratamento do TB envolve a confirmação de diagnóstico de mania ou hipomania, assim como definir o estado de humor em que o paciente se encontra. Além disso,

diversos fatores podem interferir no tratamento psicológico e farmacológico do paciente, tais como comorbidades e efeitos colaterais dos medicamentos (Grande et al., 2014). Os medicamentos mais comuns para o tratamento agudo de mania e depressão são os estabilizadores de humor e antipsicóticos, sendo que os antipsicóticos podem possuir um início de ação mais rápida quando comparados a outros medicamentos (Grande e Vieta, 2015; Goikolea et al., 2013). É descrito na literatura que o Li (estabilizador de humor) e a quetiapina (antipsicótico) são altamente recomendados também no tratamento a longo prazo para pacientes com TB (Miura et al., 2014). Corroborando com esses dados, no presente estudo foi observado que, dentre os três medicamentos mais utilizados pelos pacientes, encontravam-se o Li e a quetiapina. Outro medicamento que se encontrou entre os três mais usados no presente estudo, foi o clonazepam. Apesar da controvérsia sobre os riscos e benefícios do uso de benzodiazepínicos, esses medicamentos são usados em 25-90% dos pacientes com TB (Perlis et al., 2010; Bjorklund et al., 2016). Entretanto, é descrito que pacientes que fazem uso prolongado de benzodiazepínicos, como o clonazepam, podem se tornar dependentes, sugerindo que o tratamento com essa classe de medicamentos deve acontecer de forma restritiva (Wingard et al., 2018).

Assim como já citado anteriormente, vem sendo descrito que a GSK-3 está envolvida na patogênese do TB. Klein e Melton (1996) descreveram que a GSK-3 β é um dos alvos de ação do Li, através de um mecanismo de inibição por competição de magnésio. São descritos pelo menos 50 substratos de GSK-3 β que são moduladores chave em diversos processos relacionados com função neuronal, sendo o mais proeminente deles as moléculas Wnt (Jones et al., 2020). A via Wnt (figura 21) facilita processos como diferenciação e proliferação neuronal através de inibição da GSK-3 β , o que leva a uma translocação nuclear de β -catenina e uma subsequente ativação de diversos fatores de transcrição envolvidos em síntese de BDNF, modulação de processos inflamatórios e regulação do ritmo circadiano (Valvezan e Klein, 2012). Pandey et al. (2015) observou uma diminuição de mRNA β -catenina em regiões pré-frontais dorsolaterais e temporais de pacientes com TB. O presente estudo avaliou a atividade de GSK-3 β em pacientes com TB, entretanto não observou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. É descrito na literatura que o tratamento com Li leva a inibição de GSK-3 β em CMSP de pacientes com TB (Souza et al., 2015a,b). Além disso, outros medicamentos, como o VPA, carbamazepina, assim como antipsicóticos atípicos, possuem ação modulatória sobre a GSK-3 β (Pandey et al., 2015; Muneer, 2017; Jones et al., 2020). Em adição, antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) mostraram interagir com cascatas de Wnt/GSK-

3 β (Pilar-Cúellar et al., 2014). No presente estudo, os pacientes se encontravam em tratamento com um ou mais medicamentos, tais como o Li, VPA, carbamazepina, antipsicóticos atípicos como quetiapina e olanzapina, e também ISRS como risperidona, fluoxetina e sertralina. Essas informações podem explicar, ao menos em parte, o fato de não ter sido observado diferença significativa na atividade da GSK-3 β entre os pacientes com TB e o grupo controle.

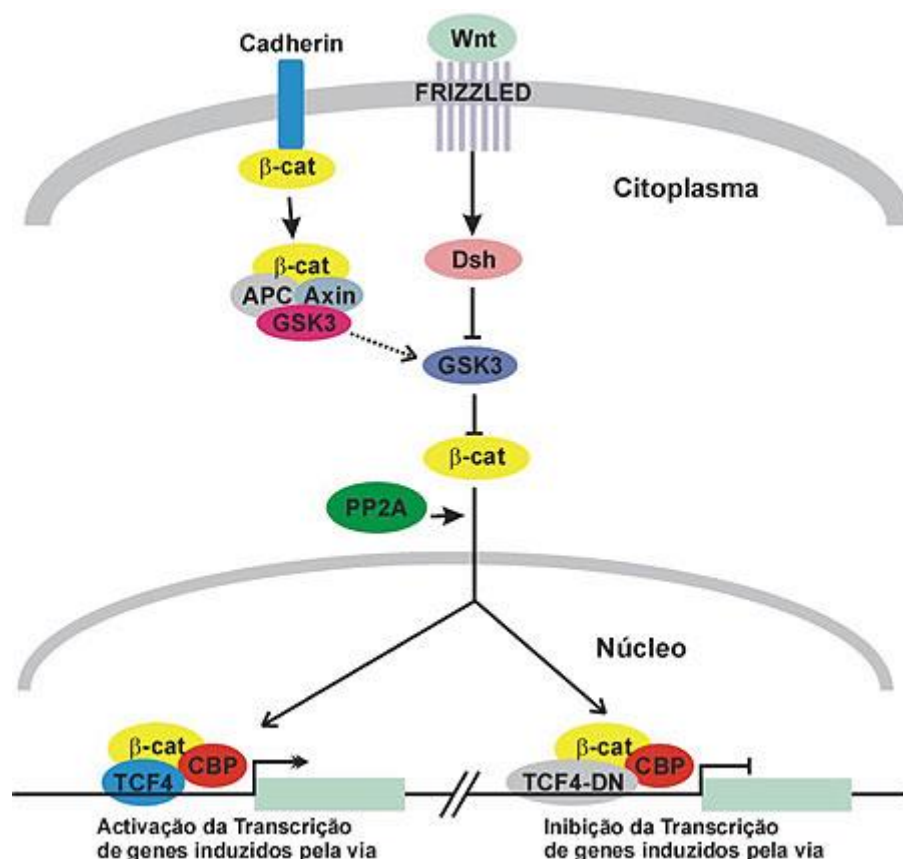


Figura 21: Via Wnt/GSK-3. Tem início no meio extracelular, através do ligante WNT, se propagando para o meio intracelular através de processos de sinalização envolvendo participantes representados acima. Vários estímulos, tais como o WNT, podem induzir a dissociação da β -Catenina, como também o seu transporte para dentro do núcleo. No interior do núcleo, a β -Catenina associada aos fatores de transcrição TCF4 e ao cofator CBP, tem a capacidade de estimular a transcrição gênica. Na presença do alelo TCF4-DN (uma mutação do TCF4), pode inibir a transcrição gênica. Louro et al., 2004.

Conforme já descrito anteriormente quando os níveis de ERO superam os mecanismos de defesa antioxidante do organismo, ocorre EO, o que pode levar a oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, se tornando uma ameaça para as células, pois pode levar a morte celular (Chen et al., 2015; Rana e Singh, 2018). Essas alterações celulares levam a formação de substâncias, que podem ser consideradas biomarcadores para a presença de dano oxidativo, tais como 4-HNE e 8-ISO (Lantos et al., 1994).

Estudos em humanos e animais têm demonstrado a presença de EO associado com as mudanças de humor observadas no TB. Marcadores com 4-HNE, 8-ISO e carbonilação de proteínas normalmente encontram-se aumentados em pacientes com TB durante um episódio de mania quando comparados com controles saudáveis (Sigitova et al., 2017). O mesmo se observa em níveis de malondialdeído (uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico) e hidroperóxido lipídico (LPH), os quais se observa um aumento durante episódios de mania em pacientes com TB (Rowland et al., 2018). Esses resultados se apresentam de forma similar quando realizados estudos utilizando modelos animais de mania (Jornada et al., 2010; Dal-Pont et al., 2019). Estudos vêm sugerindo que a GSK-3 β possui um papel importante no estresse oxidativo (Beurel et al., 2014). O presente estudo mostrou uma correlação entre a modulação de GSK-3 β , observada através do tratamento com AR-A014418, e os parâmetros de estresse oxidativo avaliados nos animais. Além disso, presente estudo encontrou um aumento nos níveis de 4-HNE e 8-ISO no sangue dos pacientes, sugerindo a presença de dano oxidativo. Entretanto, quando os níveis de 4-HNE e 8-ISO foram correlacionados com a atividade de GSK-3 β , o que se observou foi uma correlação negativa, ou seja, quando um aumenta, o outro diminui. É descrito na literatura que outros mecanismos podem levar a dano oxidativo, tais como vias de proteína quinase C (PKC) (Steckert et al., 2012; Dal-Pont et al., 2019).

A PKC possui um papel fundamental na regulação e liberação de neurotransmissores, assim como na excitabilidade neuronal, o que a torna extremamente importante na modulação da plasticidade sináptica e da expressão gênica (Diazgranados e Zarate, 2008; Abrial et al., 2011). Abrial et al. (2013) descreve que a ativação da PKC induz comportamentos do tipo maníaco, assim como sua inibição produz efeitos antimaníacos. A inibição da enzima Sódio-Potássio de Adenosina Trifosfatase (Na^+/K^+ -ATPase) através da administração intracerebroventricular de ouabaína (OUA) induz a despolarização e subsequente excitação neuronal, o que leva a um aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular via sistema de troca $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ e liberação de neurotransmissores (Scheiner-Bobis, 2002; Albers e Siegel, 2012). Essas alterações na Na^+/K^+ -ATPase podem ativar cascatas de sinalização, como por exemplo PKC e GSK-3, as quais podem modular alterações comportamentais em roedores (Valvassori et al., 2017; Dal-Pont et al., 2019). Esses eventos moleculares podem estar associados com a hiperatividade em ratos e episódios de mania em pacientes com TB (Jornada et al., 2011; Banerjee et al., 2012; Dal-Pont et al., 2019). A quercetina é um flavonol que contém uma estrutura polifenólica que elimina os radicais livres e, portanto, atua como antioxidante, além de exibir inibição pleiotrópica inespecífica da PKC (Russo et al., 2014).

Kanazawa et al. (2016) mostraram que a administração de querectina é capaz de reverter aumento de peroxidação lipídica no cérebro de roedores submetidos a um modelo animal de mania. A administração de TMX em modelos animais de mania é capaz de reverter e prevenir EO, sugerindo que a presença de EO pode estar mesmo relacionada com efeitos originados de cascatas de sinalização de PKC (Steckert et al., 2012). Portanto, os pesquisadores acreditam que, apesar da influência da GSK-3 β em mecanismos de estresse oxidativo, no presente estudo essas alterações nos níveis de 4-HNE e 8-ISO nos pacientes não estejam associadas, ou pelo menos não somente associadas, com alterações na atividade de GSK-3 β , mas sim com outras vias de sinalização, como por exemplo, vias de PKC.

A tabela 2 mostra uma breve comparação entre os dois experimentos realizados no presente estudo.

Efeitos do AR-A014418 no modelo animal de mania		Efeitos da Ouabaína		AR-A014418 x Ouabaína	
Parâmetros comportamentais	Crossing	↑		↓	
	Rearing	↑		↓	
	Visitas ao centro	↑		↓	
	Grooming	↑		↓	
	Sniffing	↑		↓	
		Córtex Frontal	Hipocampo	Córtex Frontal	Hipocampo
Análises bioquímicas	Sup. Part. Submit.	↑	↑	↓	↓
	LPH	↑	↑	↓	↓
	4-HNE	↑	↑	↓	↓
	8-ISO	↑	↑	↓	-
	Carbonil	↑	↑	↓	↓
	3-Nitrotirosina	↑	↑	↓	↓
	Catalase	↓	↓	↑	↑
	Sup. Dismutase	↑	↑	-	↓
	GPx	↑	↑	↓	-
	GR	↑	↑	-	-
Análises em linfócitos de pacientes		Controles Saudáveis		Pacientes Bipolares	
Atividade de GSK-3β		-		-	
Níveis de 4-HNE		-		↑	
Níveis de 8-ISO		-		↑	
Legenda:	↑ Aumento ↓ Redução - Sem efeito/normalizados				

Tabela 2: Resultados do experimento relacionado aos efeitos do AR-A014418 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA; Resultados do experimento avaliando atividade de GSK-3 β e parâmetros de dano oxidativo em pacientes com TB.

De forma geral, foi observado nos animais alterações comportamentais similares a um episódio de mania, assim como um aumento nos parâmetros de estresse oxidativo. Nos pacientes com TB, apesar de não ter sido encontrado diferença significativa na atividade de GSK-3 β quando comparados ao grupo controle, foi observado níveis aumentados de 4-HNE e 8-ISO, indicando a presença de dano oxidativo. Os animais, quando tratados com o inibidor de GSK-3 β , AR-A014418, mostraram uma normalização tanto dos parâmetros comportamentais, quanto dos parâmetros de estresse oxidativo de forma geral, sugerindo um envolvimento da GSK-3 β nesses mecanismos. Já os pacientes, mesmo sem diferença significativa na atividade da GSK-3 β quando comparados com o grupo controle, ainda sim apresentaram aumentos nos níveis dos dois biomarcadores de dano oxidativo avaliados, sugerindo que neste caso, possa haver outras vias de sinalização envolvidas nesses mecanismos, conforme especulado, vias de PKC. Entretanto, sabe-se que no organismo não existe apenas uma via trabalhando, mas sim, vários sistemas que trabalham em conjunto para um bom funcionamento do organismo.

Como limitações do estudo, existem alguns pontos importantes, que talvez possam ser abordados em uma outra pesquisa, como: a inclusão de fêmeas, que hoje em dia se sabe da importância de avaliar ambos os sexos nas pesquisas, entretanto, no início do estudo ainda era costume utilizar apenas machos para maior homogeneidade da amostra; e avaliar os efeitos da OUA após 14 dias sobre os parâmetros avaliados, uma vez que é descrito que a OUA após 14 dias induz comportamentos do tipo depressivo nos animais, caracterizando o outro episódio do TB.

Portanto, apesar de não ter sido encontrado uma correlação da atividade de GSK-3 β com os biomarcadores de dano oxidativo nos pacientes, e com algumas limitações que podemos encontrar no estudo, não se pode descartar esta enzima como um possível alvo terapêutico para o TB. Sendo assim, é de extrema importância que se façam mais estudos avaliando esses mecanismos.

6 CONCLUSÃO

Na parte pré-clínica do presente estudo, foi observado que a OUA levou a alterações comportamentais nos animais, semelhantes às de um episódio de mania, assim como favoreceu o estresse oxidativo. Foi observado que o tratamento com o AR-A014418 normalizou essas alterações induzidas pela OUA, sugerindo um envolvimento da GSK-3 β nesses mecanismos. Cabe ressaltar que esse foi o primeiro estudo avaliando os efeitos do AR-A014418 sobre parâmetros de estresse oxidativo em um modelo animal de mania induzido por OUA. Já na parte clínica, não foi observado diferença significativa na atividade de GSK-3 β entre os pacientes com TB e os controles saudáveis. Esse fato pode ser associado ao tratamento com diferentes medicações, as quais podem modular a atividade da GSK-3 β . Além disso, foi observado um aumento nos biomarcadores de dano oxidativo nos pacientes, o qual pode ser atribuído a outros mecanismos intracelulares, paralelos a GSK-3 β . Entretanto, isso não descarta a importância de se estudar a GSK-3 β como um possível alvo terapêutico para o TB.

O presente estudo permitiu caracterizar melhor a influência da GSK-3 β em alterações comportamentais e bioquímicas envolvidas no TB. Compreender mecanismos fisiológicos envolvidos em transtornos psiquiátricos é uma tarefa extremamente difícil, que demanda de muito esforço e recursos. Sendo assim, é de extrema importância que se façam mais estudos para melhor caracterizar esses mecanismos.

REFERÊNCIAS

- Abrial E, Lcas G, Scarna H, Haddjeri N, Lambás-Señas N. A Role for the PKC Signaling System in the Pathophysiology na Treatment of Mood Disorders: Involvement of a Functional Imbalance? *Mol Neuroiol.* 2011; 44:407-19.
- Abrial E, Etievant A, Bétry C, Scarna H, Lucas G, Haddjeri N, Lambás-Señas L, (2013). Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* Jun 3;43:40-8.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105 (1):121-6.
- Albers RW, Siegel GJ, (2012). Membrane transport. S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, D. Price (Eds.), *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology* (8th ed.), Elsevier Academic Press, Massachusetts, USA, pp. 41–62.
- Altshuler LL, Conrad A, Hauser P, Li XM, Guze BH, Denikoff K, Tourtellotte W, Post R. Reduction of temporal lobe volume in bipolar disorder: a preliminary report of magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry.* 1991;48(5):482-3.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Washington, DC; 2013.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN (2008) Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* 111(2–3):135–144
- Andriantsitohaina R, Duluc L, García-Rodríguez JC, Gil-del Valle L, Guevara-Garcia M, Simard G, Soleti R, Su DF et al (2012). Systems biology of antioxidants. *Clin Sci (Lond)* 123(3):173–192
- Arnold, L.M. - Gender Differences in Bipolar Disorder. *Psychiatr Clin North Am* 26: 595-620, 2003.

Azorin JM, Kaladjian A. An update on the treatment of bipolar depression. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(2):161-72.

Bali A, Jaggi AS. Anti-stress effects of a GSK-3 β inhibitor, AR-A014418, in immobilization stress of variable duration in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2017.

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

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987; 32(1):279-312.

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

Bavaresco DV, Schwalm MT, Farias BM, Ceretta LB, Rosa MID, Valvassori SS. Increased oxidative stress in the blood of ostomy patients. *Arq Gastroenterol*. 2018 Apr-Jun;55(2):164-169.

Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):5099–5104

Beigel A, Murphy DL, Bunney WEJ. The manic-state rating scale: scale construction, reliability, and validity. *Arch Gen Psychiatry*. 25: 256–262, 1971.

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PV, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):804-17.

Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015 Apr;148:114-31.

Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol.* 2006 Jul;79(4):173-89.

Bijur GN, Jope RS (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem* 276:37436–37442

Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 β is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*, 14 (2003), pp. 2415-2419.

Birden E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO* 5:9–19

Bjorklund L, Horsdal HT, Mors O, Ostergaard SD, Gasse C. Trends in the psychopharmacological treatment of bipolar disorder: a nationwide register-based study. *Acta Neuropsychiatr.* 2016;28:75-84

Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 1998, 275, F633–F650.

Blass JP, Brown AM. Lower activity of Krebs cycle enzymes than of electron transport in human brain: disease implications. *Neurobiology of Aging*, 2000. 21, p. 81.

Blumberg HP, Stern E, Martinez D, Ricketts S, de Assis J, White T, Epstein J, Isenberg N, McBride PA, Kemperman I, Emmerich S, Dhawan V, Eidelberg D, Kocsis JH, Silbersweig DA. Rostral and orbital precortex frontal dysfunction in the manic state of bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 1999;156(12):1986-8.

Bosaipo NB, Borges VF, Juruena MF. Transtorno Bipolar: uma revisão dos aspectos conceituais e clínicos. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* 2017;50(Supl.1),jan-fev.:72-84.

Boveris A, Noir BA, Perez V, Stoppani AO. The function of liver mitochondria after steroid administration. *Rev Soc Argent Biol.* 1972 48-49(1-8):73-83

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* 1984 105:429-435

Brocardo PS, Budni J, Pavesi E, Franco JL, Uliano-Silva M, Trevisan R, Terenzi MG, Dafre AL et al (2010) Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. *Bipolar Disord* 12(4):414-424

Brüning CA, Prigol M, Luchese C, Pinton S, Nogueira CW (2012) Diphenyl diselenide ameliorates behavioral and oxidative parameters in an animal model of mania induced by ouabain. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 38(2):168-174

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985; 113(1):484-90.

Chalecka-Franaszek E, Chuang D (1999) Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Neurobiology Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15):8745-8750

Chen B, Lu Y, Chen Y, Cheng J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries *J. Endocrinol.* 2015 225, pp. R83-R99.

Cheniaux E. O tratamento farmacológico do transtorno bipolar: uma revisão sistemática e crítica dos aspectos metodológicos dos estudos clínicos modernos. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33:72 – 80.

Cikankova T, Sigitova E, Zverova M, Fisar Z, Raboch J, Hroudova J. Mitochondrial Dysfunctions in Bipolar Disorder: Effect of the Disease and Pharmacotherapy. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 2017, 16, 176-186.

Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front. Physiol.* 2017, 8, 371.

Cooper GM. A célula: Uma abordagem multidisciplinar. 2 ed., Artes Médicas, Porto Alegre, 2001.

Coppen A, Shaw DM, Malleson A, Costain R. Mineral metabolism in mania. *Br Med J*. 1966 Jan 8;1(5479):71-5.

Costa AMN. Transtorno afetivo bipolar: carga da doença e custos relacionados. *Rev. Psiquiatr Clín*. 2008;35(3):104-10.

Coyle JT, Duman RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron*. 2003 Apr 24;38(2):157-60.

Crowder RJ, Freeman RS. Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34266-71.

Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 398: 215-219. 2006.

Dal-Pont GC, Resende WR, Bianchini G, et al. Tamoxifen has an anti-manic effect but not protect the brain against oxidative stress in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res*. 2019;113:181-189.

Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 1995. 61: 1–31.

De Berardis D, Campanella D, Gambi F, la Rovere R, Carano A, Conti CM, Sivestrini C, Serroni N, Piersanti D, di Giuseppe B, Moschetta FS, Cotellessa C, Fulcheri M, Salerno RM, Ferro FM. The role of C-reactive protein in mood disorders. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2006, 19, 721–725.

de la Vega D, Piña A, Peralta FJ, Kelly SA, Giner L. A Review on the General Stability of Mood Disorder Diagnoses Along the Lifetime. *Curr Psychiatry Rep*. 2018 Apr 2; 20(4):29.

de Sousa RT, Zanetti MV, Talib LL, Serpa MH, Chaim TM, Carvalho AF, Brunoni AR, Busatto GF, Gattaz WF, Machado-Vieira R. Lithium increases platelet serine-9 phosphorylated GSK-3 β levels in drug-free bipolar disorder during depressive episodes. *J Psychiatr Res.* 2015 Mar; 62:78-83.

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 Mar;50:36-41.

de Sousa RT, Streck EL, Zanetti MV et al (2015a) Lithium increases leukocyte mitochondrial complex I activity in bipolar disorder during depressive episodes. *Psychopharmacology (Berl)* 232(1):245.

de Sousa RT, Zanetti MV, Talib LL, Serpa MH, Chaim TM, Carvalho AF, Brunoni AR, Busatto GF, Gattaz WF, Machado-Vieira R (2015b) Lithium increases platelet serine-9 phosphorylated GSK-3 β levels in drug-free bipolar disorder during depressive episodes. *J Psychiatr Res* 62:78–83.

De-Paula VJ, Gattaz WF, Forlenza OV. Long-term lithium treatment increases intracellular and extracellular brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cortical and hippocampal neurons at subtherapeutic concentrations. *Bipolar Disord.* 2016 Dec;18(8):692-695.

Del-bem CM, Vilela JAA, Crippa JAS, Hallak JEC, Labate CM, Zuardi AW. Test-retest reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV - Clinical Version (SCID-CV) translated into portuguese. *Rev Bras Psiquiatr.* 2001; 23: 156-159.

DiazGranados N, Zarate CA Jr, (2008). A review of the preclinical and clinical evidence for protein kinase C as a target for drug development for bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep.* Dec;10(6):510-9.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499–3511

Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003 Apr 1;116(Pt 7):1175-86.

Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci.* 2003 Aug 13;23(19):7311-6.

Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 1990;1(6):469-490.

El-Mallakh RS, El-Masri MA, Huff MO, Li XP, Decker S, Levy RS. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. *Bipolar Disord.* 2003 Oct;5(5):362-5.

Emamghoreishi M, Keshavarz M, Nekooeian AA. Acute and chronic effects of lithium on BDNF and GDNF mRNA and protein levels in rat primary neuronal, astroglial and neuroastroglia cultures. *Iran J Basic Med Sci.* 2015 Mar; 18(3):240-6.

Eom TY, Joep RS. Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3alpha/beta impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol Psychiatry.* 2009 Sep 1;66(5):494-502.

Erdem MAS, Pan E, Kurt YG. Bipolar Disorder and Oxidative Stress. *J. Mood Disord.* 2014, 4, 70–79.

Fenocchio AS, Venere PC, Cesar ACG, Dias AL, Bertollo LAC. Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia* 1991. 44, 161-166.

Ferreira FG, Polli MC, Oshima-Franco Y, Fraceto LF. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. *Revista Eletrônica de Farmácia.* Goiás, v.6, n.1, p.14-24, 2009.

Fountoulakis KN, Vieta E, Siamouli M, Valenti M, Magiria S, Oral T, Fresno D, Giannakopoulos P, Kaprinis GS. Treatment of bipolar disorder: a complex treatment for a multi-faceted disorder. *Ann Gen Psychiatry.* 2007;6:27.

Frey BN, Fonseca MM, Machado-Vieira R, Soares JC, Kapczinski F. Neuropathological and neurochemical abnormalities in bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004 Sep;26(3):180-8.

Fries GR, Pfaffenseller B, Stertz L, Paz AV, Dargél AA, Kunz M, Kapczinski F. Staging and neuroprogression in bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 2012; 14(6):667-75.

Gawlik-Kotelnicka O, Mielicki W, Rabe-Jabłońska J, Lazarek J, Strzelecki D. Impact of lithium alone or in combination with haloperidol on oxidative stress parameters and cell viability in SH-SY5Y cell culture. *Acta Neuropsychiatr.* 2016 Feb;28(1):38-44.

Goichberg P, Kalinkovich A, Borodovsky N, Tesio M, Petit I, Nagler A, Hardan I, Lapidot T. cAMP-induced PKC ζ activation increases functional CXCR4 expression on human CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Blood.* 2006; 107(3):870-9.

Goikolea JM, Colom F, Capapey J, et al. Faster onset of antimanic action with haloperidol compared to second-generation antipsychotics: a meta-analysis of randomized clinical trials in acute mania. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013; 23: 305–16.

Goldberg JF, Harrow M, Whiteside JE. Risk for bipolar illness in patients initially hospitalized for unipolar depression. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 1265–70

Goldstein I, Levy T, Galili D, Ovadia H, Yirmiya R, Rosen H, Lichtstein D. Involvement of Na(+), K(+)-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Biol Psychiatry.* 2006 Sep 1;60(5):491-9.

Goodwin, F.K., Jamison, K.R. Manic-depressive illness: bipolar and recurrent unipolar disorders. 2ed. New York: Oxford University Press; 2003.

Gordon R, Hogan CE, Neal ML, Anantharam V, Kanthasamy AG, Kanthasamy A. A simple magnetic separation method for high-yield isolation of pure primary microglia. *J Neurosci Methods.* 2011 Jan 15;194(2):287-96.

Gould TD, Einat H, Bhat R, Manji HK. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004 Dec;7(4):387-90.

Gould TD, Picchini AM, Einat H, Manji HK. Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Curr Drug Targets*. 2006 Nov;7(11):1399-409.

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

Grande I, Bernardo M, Bobes J, Saiz-Ruiz J, Álamo C, Vieta E. Antipsychotic switching in bipolar disorders: a systematic review. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014; 17: 497–507

Grande I, Vieta E. Pharmacotherapy of acute mania: monotherapy or combination therapy with mood stabilizers and antipsychotics? *CNS Drugs* 2015; 29: 221–27.

Guerra ABG, Calil HM. Bipolar Disorder in Women. *Rev. Psiqu. Clín.* 32, supl 1; 110-116, 2005.

Haenisch B, Bönisch H. Depression and antidepressants: Insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacol Ther*. 2011; 129:352–68.

Hallahan B, Newell J, Soares JC, Brambilla P, Strakowski SM, Fleck DE, Kieseppä T, Altshuler LL, Fornito A, Malhi GS, McIntosh AM, Yurgelun-Todd DA, Labar KS, Sharma V, MacQueen GM, Murray RM, McDonald C. Structural magnetic resonance imaging in bipolar disorder: an international collaborative mega-analysis of individual adult patient data *Biol. Psychiatry*, 69 (2016), pp. 326-335.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. 1999 New York 3rd ed.

Hamdani N, Doukhan R, Kurtlucan O, Tamouza R, Leboyer M. Immunity, inflammation, and bipolar disorder: Diagnostic and therapeutic implications. *Curr. Psychiatry Rep.* 2013, 15, 387.

Hirschfeld RM. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2014;169 Suppl 1:S12-S16.

Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase. *J Biol Chem* 272:25326–25332.

Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K et al (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase 1/glycogen synthase kinase 3 β in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2719–2723.

Idris I, Gray S, Donnelly. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 2001;44:659-73.

Johnston BB, Naylor GJ, Dick EG, Hopwood SE, Dick DA (1980) Prediction of clinical course of bipolar manic depressive illness treated with lithium. *Psychol Med* 10:329–334.

Jones GH, Rong C, Shariq AS, Mishra A, Machado-Vieira R. Intracellular Signaling Cascades in Bipolar Disorder. *Curr Top Behav Neurosci.* 2020 Aug 29.

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

Kanazawa LK, Vecchia DD, Wendler EM, Hocayen PA, Dos Reis Livero FA, Stipp MC, Barcaro IM, Acco A, Andreatini R. Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. *Free Radic Biol Med.* 2016;99:79–86.

Keck PE, McElroy SL, Arnold LM. Bipolar disorder. *Med Clin North Am* 2001;85(3): 645-61

Kim SH, Yu HS, Park HG, Ha K, Kim YS, Shin SY, Ahn YM. Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates mTOR signal pathways and protein translation in the rat *córtex* frontal. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2013, 45, 73–82.

Kimura H, Liu S, Yamada S, Uchida K, Matsumoto K, Mukaida M, Yoshida K. Rapid increase in serum lipid peroxide 4-hydroxynonenal (HNE) through monocyte NADPH oxidase in early endo-toxemia. *Free Radic Res.* 2005; 39(8):845-51.

Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 6;93(16):8455-9.

Lantos J, Temes G, Roth R, Morvay G. Alterations in malondialdehyde concentration of jugular vein blood following transient brain ischemia. The effect of lactic acidosis *Acta Physiol Hung.* 1994, 82 pp. 229-236.

Lavandeira FMF. Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos [Dissertação]. Porto, Portugal. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa; 2014.

Lee YC, Shi YJ, Wang LJ, Chiou JT, Huang CH, Chang LS. GSK3 β suppression inhibits MCL1 protein synthesis in human acute myeloid leukemia cells. *J Cell Physiol.* 2021 Jan;236(1):570-586.

Leibenluft, L. - Women with Bipolar Illness: Clinical and Research Issues. *Am J Psychiatry* 153: 163-173, 1996.

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

Li R, Liu Y, Chen N, Zhang Y, Song G, Zhang Z (2016) Valproate attenuates nitroglycerin-induced trigeminovascular activation by preserving mitochondrial function in a rat model of migraine. *Med Sci Monit* 22:3229–3237

Lichtstein D, Ilani A, Rosen H, Horesh N, Singh SV, Buzaglo N, Hodes A. Na⁺, K⁺-ATPase Signaling and Bipolar Disorder. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 7;19(8).

Lingrel JB, Williams MT, Vorhees CV, Moseley AE. Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007, 39, 385–389.

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

Louro ID, Paneto GG, Careta FP, Vianna BA, Verbeno BM, Oyama MC. A descoberta de vias metabólicas celulares participantes de processos oncogênicos e o desenvolvimento de farmacoterapias específicas. Sociedade Íbero-Americana de Informações Científicas. 1ªEd. Buenos Aires, Setembro, 2004.

Lowry H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, 193 (1) (1951 Nov), pp. 265-275.

Ludka FK, Constantino LC, Dal-Cim T, Binder LB, Zomkowski A, Rodrigues AL, Tasca CI Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 β and mTOR in the antidepressant-like effect of atorvastatin in mice. *J Psychiatr Res*, 2016. 82:50–57.

Macêdo DS, de Lucena DF, Queiroz AI, Cordeiro RC, Araújo MM, Sousa FC, Vasconcelos SM, Hyphantis TN, Quevedo J, McIntyre RS, Carvalho AF. Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate: relevance as an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Jun 3; 43:230-7.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2004. 28 (2), pp. 209–224.

Manji HK, Chen G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Mol Psychiatry*. 2002;7 Suppl 1:S46-56.

Maqbool M, Mobashir M, Hoda N (2015) Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: a therapeutic target for Alzheimer's disease *Eur. J Med Chem* jan 107:63–81

Marnett LJ. Lipid peroxidation and DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 424 1999, pp. 83–95.

Martins DF, Rosa AO, Gadotti VM, Mazzardo-Martins L, Nascimento FP, Egea J, López MG, Santos AR. The antinociceptive effects of AR-A014418, a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta, in mice. *J Pain*. 2011 Mar;12(3):315-22.

McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16:R551–R560

Ministério da Saúde. Strengthening clinical research in Brazil: the importance of registering clinical trials. *Rev Saúde Pública* 2011;45(2):436-9.

Miura T, Noma H, Furukawa TA, et al. Comparative efficacy and tolerability of pharmacological treatments in the maintenance treatment of bipolar disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry* 2014; 1: 351–59.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960 Sep;20:613-6.

Morris G, Walder K, McGee SL, Dean OM, Tye SJ, Maes M, Berk M. A model of the mitochondrial basis of bipolar disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2017, 74, 1–20.

Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, Vorhees CV, Lingrel JB. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J. Neurosci*. 2007, 27, 616–626.

Moylan S, Berk M, Dean OM, Samuni Y, Williams LJ, O'Neil A, Hayley AC, Pasco JA, Anderson G, Jacka FN, Maes M. Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Sep;45:46-62.

Muneer A (2017) Wnt and GSK3 signaling pathways in bipolar disorder: clinical and therapeutic implications. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 15(2):100–114.

Murray G, Lam RW, Beaulieu S, Sharma V, Cervantes P, Parikh SV, Yatham LN. Do symptoms of bipolar disorder exhibit seasonal variation? A multisite prospective investigation. *Bipolar Disord*. 2011 Nov-Dec;13(7-8):687-95.

Naylor GJ, Smith AH, Dick EG, Dick DA, McHarg AM, Chambers CA (1980) Erythrocyte membrane cation carrier in manic-depressive psychosis. *Psychol Med* 10:521–525.

Neto, J.G.; Junior, M.S.C.; Hubner, C.K. Escala de Depressão de Hamilton (HAM-D): Revisão dos 40 anos de sua utilização. *Ver. Fac. Ciênc. Méd.* 3(1): 10-14. 2001.

Okusaga OO. Accelerated aging in schizophrenia patients: the potential role of oxidative stress. *Aging Dis*. 2013 5: 256–262.

Otten M, Meeter M. Hippocampal structure and function in individuals with bipolar disorder: a systematic review. *J. Affect. Disord.*, 174 (2015), pp. 113-125.

Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2010 Jan-Feb;3(1):2-12.

Pandey GN, Rizavi HS, Tripathi M, Ren X (2015) Region-specific dysregulation of glycogen synthase kinase-3 β and β -catenin in the postmortem brains of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord* 17:160–171.

Perlis RH, Ostacher MJ, Miklowitz DJ, et al. Benzodiazepine use and risk of recurrence in bipolar disorder: a STEP-BD report. *J Clin Psychiatry*. 2010;71:194-200.

Pero RW, Roush GC, Markowitz MM, Miller DG. Oxidative stress, DNA repair, and cancer susceptibility. *Cancer Detect Prev*. 1990, 14: 555–56.

Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, Lane R. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry*. 2003;54(5):504-14.

Pilar-Cúellar F, Vidal R, Díaz A, Castro E, dos Anjos S, Vargas V, Romero B, Valdizán EM (2014) Signaling pathways involved in antidepressant-induced cell proliferation and synaptic plasticity. *Curr Pharm Des* 20(23):3776–3794.

Prickaerts J, Moechars D, Cryns K, Lenaerts I, van Craenendonck H, Goris I, Daneels G, Bouwknecht JA, Steckler T. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3 β : a putative model of hyperactivity and mania. *J Neurosci*. 2006 Aug 30;26(35):9022-9.

Rana AK, Singh D. Targeting glycogen synthase kinase-3 for oxidative stress and neuroinflammation: Opportunities, challenges and future directions for cerebral stroke management. *Neuropharmacology*. 2018 Sep 1;139:124-136.

Rashvand M, Danyali S, Manaheji H. The Potential Role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Neuropathy-Induced Apoptosis in Spinal Cord. *Basic Clin Neurosci*. 2020 Jan-Feb;11(1):15-30.

Reddy PL, Khanna S, Subhash MN, Channabasavanna SM, Rao BS (1992) Erythrocyte membrane sodium–potassium adenosine triphosphatase activity in affective disorders. *J Neural Transm Gen Sect* 89:209–218

Riegel RE, Valvassori SS, Elias G, Réus GZ, Steckert AV, de Souza B, Petronilho F, Gavioli EC et al (2009) Animal model of mania induced by ouabain: evidence of oxidative stress in submitochondrial particles of the rat brain. *Neurochem Int* 55(7):491–495

Riegel RE, Valvassori SS, Moretti M, Ferreira CL, Steckert AV, de Souza B, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Intracerebroventricular ouabain administration induces oxidative stress in the rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 2010 May;28(3):233-7.

Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Wallace DC, Bunney WE, Vawter MP. Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One*. 2009;4(3):e4913.

Rowland T, Perry BI, Upthegrove R, et al. Neurotrophins, cytokines, oxidative stress mediators and mood state in bipolar disorder: systematic review and meta-analyses. *Br J Psychiatry*. 2018;213(3):514-525.

Rowlands DJ (2016) Mitochondria dysfunction: a novel therapeutic target in pathological lung remodeling or bystander? *Pharmacol Ther* 166:96–105.

Russo GL, Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Iannitti R, Palumbo R. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Cancer Treat Res*. 2014; 159():185-205.

Schaan BD. Role of Protein Kinase C in the Development of Vascular Complications of Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47/6:654-662.

Scheiner-Bobis G, (2002). The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur J Biochem*, 269, pp. 2424–2433

Schneider B, Prvulovic D. Novel biomarkers in major depression. *Curr Opin Psychiatry*. 2013; 26(1):47-53.

Sheline Yi, Gado MH, Price JL. Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. *Neuroreport*. 1998;9(9):2023-8.

Silva LOL, Dias CA, Rosalino FU. Processos terapêuticos no tratamento do transtorno afetivo bipolar: revisão integrativa. *Rev. Psicol. Saúde*. 2017; 9(3): 63-76.

Souza LC, Wilhelm EA, Bortolatto CF, Nogueira CW, Boeira SP, Jesse CR (2014) The protective effect of melatonin against brain oxidative stress and hyperlocomotion in a rat model of mania induced by ouabain. *Behav Brain Res* 271:316–324.

Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6:1664–1668

Steckert AV, Valvassori SS, Moretti M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochem Res*. 2010, 35:1295–1301.

Steckert AV, Valvassori SS, Mina F, Lopes-Borges J, Varela RB, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Protein kinase C and oxidative stress in an animal model of mania. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9:47–57

Sui L, Song XJ, Ren J, Ju LH, Wang Y (2013) Intracerebroventricular administration of ouabain alters synaptic plasticity and dopamine release in rat medial precórtex frontal. *J Neural Transm (Vienna)* 120(8):1191–1199

Traub N, Lichtstein D. The mood cycle hypothesis: possible involvement of steroid hormones in mood regulation by means of Na⁺, K⁺-ATPase inhibition. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2000;11:375–94.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84

Valvassori SS, Dal-Pont GC, Resende WR, Jornada LK, Peterle BR, Machado AG, Farias HR, de Souza CT, Carvalho AF, Quevedo J. Lithium and valproate act on the GSK-3 β signaling pathway to reverse manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. *Neuropharmacology*. 2017a May 1;117:447-459.

Valvassori SS, Dal-Pont GC, Resende WR, Varela RB, Peterle BR, Gava FF, Mina FG, Cararo JH, Carvalho AF, Quevedo J. Lithium and Tamoxifen Modulate Behavior and Protein Kinase C Activity in the Animal Model of Mania Induced by Ouabain. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017b Nov 1;20(11):877-885.

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

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 Jun 4;9(1):158

Valvezan AJ, Klein PS (2012) GSK-3 and Wnt signaling in neurogenesis and bipolar disorder. *Front Mol Neurosci* 5(1):1

Viana MC, Andrade LH. Lifetime prevalence, age and gender distribution and age-of-onset of psychiatric disorders in the São Paulo Metropolitan Area, Brazil: results from the São Paulo Megacity Mental Health Survey. *Ver Bras Psiquiatr*. 2012; 34(3):249-60.

Vilela JAA, Crippa JAS, Del-bem CM, Loureiro SR. Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. *Braz J Med Biol Res*. 38(9): 1429-1439. 2005.

Weisler RH, Nolen WA, Neijber A, Hellqvist A, Paulsson B, Trial 144 Study Investigators. Continuation of quetiapine versus switching to placebo or lithium for maintenance treatment of bipolar I disorder (Trial 144: a randomized controlled study). *J Clin Psychiatry*. 2011 Nov; 72(11):1452-64.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981; 77(1):325- 33.

Wingård L, Taipale H, Reutfors J, et al. Initiation and long-term use of benzodiazepines and Z-drugs in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2018;20(7):634-646.

Won E, Kim YK. An Oldie but Goodie: Lithium in the Treatment of Bipolar Disorder through Neuroprotective and Neurotrophic Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 11;18(12).

Xie Z, Cai T. Na⁺K⁺ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 2003; 3:157–168.

Xie Z, Kometiani P, Liu J, Li J, Shapiro JI, Askari A. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺K⁺ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1999; 274:19323–19328.

Xing B, Liang XP, Liu P, Zhao Y, Chu Z, Dang YH (2015) Valproate inhibits methamphetamine induced hyperactivity via glycogen synthase kinase 3 β signaling in the nucleus accumbens core. *PLoS One* 10(6):e0128068

Xing HY, Cai YQ, Wang XF, Wang LL, Li P, Wang GY, Chen JH (2015b) The cytoprotective effect of hyperoside against oxidative stress is mediated by the Nrf2-ARE signaling pathway through GSK-3 β inactivation. *PLoS One* 10(12):e0145183

Xue Z, Li B, Gu L, Hu X, Li M, Butterworth RF, Peng L. Increased Na, K-ATPase α 2 isoform gene expression by ammonia in astrocytes and in brain in vivo. *Neurochem Int*. 2010 Nov;57(4):395-403.

Yan J, Liu XH, Han MZ, Wang YM, Sun XL, Yu N, Li T, Su B et al (2015) Blockage of GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 36(1):211–227

Yasuyama T, Ohi K, Shimada T, Uehara T, Kawasaki Y. Differences in social functioning among patients with major psychiatric disorders: interpersonal communication is impaired in patients with schizophrenia and correlates with an increase in schizotypal traits. *Psychiatry Res*. 2017;249:30–4.

Zarate CA Jr, Singh J, Manji HK (2006) Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 59(11):1006–1020

Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Dimascio LN, Ilkayeva O, Kelekar A, Reya T, Rathmell JC. Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol.* 2007 Jun;27(12):4328-39.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título da Pesquisa: Avaliar os efeitos do AR-A014418 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos no Transtorno Bipolar.

Objetivo: Avaliar os efeitos do AR-A014418 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos no Transtorno Bipolar.

Período da coleta de dados: 10/02/2017 a 30/06/2020

Tempo estimado para cada coleta: 1 hora 30 minutos

Local da coleta: Clínicas Integradas da UNESC

Pesquisador/Orientador: Samira da Silva Valvassori

Telefone: 48 3431-2792

Pesquisador/Acadêmico: Gustavo Colombo Dal Pont

Telefone: 48 3431-2643

Como convidado(a) para participar voluntariamente da pesquisa acima intitulada e aceitando participar do estudo, declaro que:

Poderei desistir a qualquer momento, bastando informar minha decisão diretamente ao pesquisador responsável ou à pessoa que está efetuando a pesquisa.

Por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro, não haverá nenhuma remuneração, bem como não terei despesas para com a mesma. No entanto, fui orientado(a) da garantia de ressarcimento de gastos relacionados ao estudo. Como prevê o item IV.3.g da Resolução CNS 466/2012, foi garantido a mim (participante de pesquisa) e ao meu acompanhante (quando necessário) o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte, alimentação e hospedagem (quando necessário) nos dias em que for necessária minha presença para consultas ou exames.

Foi expresso de modo claro e afirmativo o direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/ indiretos e imediatos/ tardios pelo tempo que for necessário a mim (participante da pesquisa), garantido pelo(a) pesquisador(a) responsável (Itens II.3.1 e II.3.2, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

Estou ciente da garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Item IV.3.h, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

Os dados referentes a mim serão sigilosos e privados, preceitos estes assegurados pela Resolução nº 466/2012 do CNS - Conselho Nacional de Saúde - podendo eu solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação dos dados obtidos a partir desta.

Para tanto, fui esclarecido(a) também sobre os procedimentos, riscos e benefícios, a saber:

DETALHES DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS NA PESQUISA
--

Na triagem será realizado uma entrevista estruturada para dados de identificação, sociodemográficos, nascimento e desenvolvimento infantil, histórico de doenças e hábitos de vida, em seguida será confirmado o diagnóstico pela SCID-I. Será coletado 10 ml de sangue periférico para as avaliações laboratoriais bioquímicas.
--

RISCOS

Os eventos adversos mais comuns são relacionados à venopunção, tais como hipotensão, sonolência, tontura e formação de hematoma no local. Também podem surgir reações emocionais devido às perguntas das escalas. Em caso de necessidade de acolhimento e escuta qualificada, este será providenciado pelos pesquisadores responsáveis pela pesquisa, e serão feitos os encaminhamentos necessários.
--

BENEFÍCIOS

Sem benefícios diretos para o paciente.

Declaro ainda, que tive tempo adequado para poder refletir sobre minha participação na pesquisa, consultando, se necessário, meus familiares ou outras pessoas que possam me ajudar na tomada de decisão livre e esclarecida, conforme a resolução CNS 466/2012 item IV.1.C.

Diante de tudo o que até agora foi demonstrado, declaro que todos os procedimentos metodológicos e os possíveis riscos, detalhados acima, bem como as minhas dúvidas, foram devidamente esclarecidos, sendo que, para tanto, firmo ao final a presente declaração, em duas vias de igual teor e forma, ficando na posse de uma e outra sido entregue ao(a) pesquisador(a) responsável (o presente documento será obrigatoriamente assinado na última página e rubricado em todas as páginas pelo(a) pesquisador(a) responsável/pessoa por ele(a) delegada e pelo(a) participante/responsável legal).

Em caso de dúvidas, sugestões e/ou emergências relacionadas à pesquisa, favor entrar em contato com o(a) pesquisador(a) Gustavo Colombo Dal Pont pelo telefone 48 3431-2643 e/ou pelo e-mail bipolar@unesp.net

Em caso de denúncias, favor entrar em contato com o Comitê de Ética – CEP/UNESP (endereço no rodapé da página).

O Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP) da Unesp pronuncia-se, no aspecto ético, sobre todos os trabalhos de pesquisa realizados, envolvendo seres humanos. Para que a ética se faça presente, o CEP/UNESP revisa todos os protocolos de pesquisa envolvendo seres humanos. Cabe ao CEP/UNESP a responsabilidade primária pelas decisões sobre a ética da pesquisa a ser desenvolvida na Instituição, de modo a garantir e resguardar a integridade e os direitos dos voluntários participantes nas referidas pesquisas. Tem também papel consultivo e educativo, de forma a fomentar a reflexão em torno da ética na ciência, bem como a atribuição de receber denúncias e requerer a sua apuração.

ASSINATURAS	
Voluntário(a)/Participante	Pesquisador(a) Responsável
— Assinatura Nome: _____ CPF: _____._____._____ - ____	— Assinatura Nome: _____ CPF: _____._____._____ - ____

Criciúma (SC), ____ de _____ de 20__.

APÊNDICE B – DEVOLUÇÃO AOS PARTICIPANTES



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
Ciências da Saúde
unesco

AMBULATÓRIO DE PESQUISA EM TRANSTORNO BIPOLAR

Declaramos que _____ esteve presente nas
Clínicas Integradas da UNESC no dia ____ do mês de _____ de 201__
participou como voluntário(a) em pesquisa do Ambulatório de Transtorno Bipolar.
Após a aplicação dos procedimentos descritos e apresentados no Termo de
Consentimento Livre e Esclarecido com base na resolução nº 466 de 2012, o
paciente demonstrou interesse e/ou necessidade de encaminhamento para
atendimento _____
_____.

Criciúma, ____ de _____ de 201__.

Acadêmico responsável

Voluntário

Professor Responsável



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
Ciências da Saúde
unesco

AMBULATÓRIO DE PESQUISA EM TRANSTORNO BIPOLAR

Declaramos que _____ esteve presente nas Clínicas Integradas da UNESC no dia ____ do mês de _____ de 201__ participou como voluntário(a) em pesquisa do Ambulatório de Transtorno Bipolar. Após a aplicação dos procedimentos descritos e apresentados no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o paciente não apresentou necessidade de encaminhamento ou abordagem emergencial, com base na resolução nº 466 de 2012.

Criciúma, ____ de _____ de 201__.

Acadêmico responsável

Voluntário

Professor Responsável

ANEXOS

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS




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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação Dos Efeitos De Lítio Ou Valproato Sobre A Via Da Pi3k/Akt/Gsk-3β Em Um Modelo Animal De Mania Induzido Por Ouabaina”, Protocolo n° 001/2016-1** sob a responsabilidade de **Samira da Silva Valvassori**, equipe: Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Marina Antunelli, Gustavo C. Dal-Pont, Edemilson Mariot, Camila Leite Ferreira, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

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

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

Protocol number: 001/2016-1

Principal Investigator: Samira da Silva Valvassori
Researchers: Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Marina Antunelli, Gustavo C. Dal-Pont, Edemilson Mariot, Camila Leite Ferreira, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda

Project title: “Effects Of Lithium Or Valproate On Pi3k/Akt/Gsk-3βsignaling Pathway In An Animal Model Of Mania Induced By Ouabain”.

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

Criciúma, 23 de fevereiro de 2016.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA

ANEXO II – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA E HUMANOS

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA QUINASE C EM LINFÓCITO DE PACIENTES AMBULATORIAIS COM TRANSTORNO BIPOLAR COMPARADOS A CONTROLES SAUDÁVEIS

Pesquisador: Samira da Silva Valvassori

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

Versão: 1

CAAE: 40017020.1.0000.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.410.048

Apresentação do Projeto:

O projeto tem muito boa apresentação, descrevendo de forma clara a importância da identificação marcadores moleculares em pacientes de ambulatório portadores de transtorno bipolar. Além disso os pesquisadores apresentam de forma clara todas as etapas de execução do projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos são claros no que se refere a verificação, triagem dos pacientes e procedimentos de coleta de material, bem como análises bioquímicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa menciona corretamente os riscos e benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresentada é relevante e considerável contribuição científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos, tais como autorização da Instituição na qual serão extraídos dados e materiais biológicos dos pacientes e o TCLE encontram-se corretos.

Recomendações:

Sem recomendações

Endereço: Avenida Universitária, 1.105

Bairro: Universitário

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48)3431-2808

CEP: 88.806-000

E-mail: cetica@uneso.net

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC**



Continuação do Parecer: 4.410.048

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações ou pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1659910.pdf	11/11/2020 16:39:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PKC.pdf	11/11/2020 16:38:15	Samira da Silva Valvassori	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PKC.pdf	11/11/2020 16:37:33	Samira da Silva Valvassori	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_PKC.pdf	11/11/2020 16:32:29	Samira da Silva Valvassori	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

CRICIUMA, 19 de Novembro de 2020

Assinado por:
Marco Antônio da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Universitária, 1.105

Bairro: Universitário

UF: SC

Município: CRICIUMA

CEP: 88.806-000

Telefone: (48)3431-2606

E-mail: oetica@uneso.net



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 N° 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 **DOCTORADO** apresentada pelo candidato **Gustavo Colombo Dal Pont**, sob o título “**ENVOLVIMENTO DA GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 NO TRANSTORNO BIPOLAR: UMA PESQUISA TRANSLACIONAL**” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 30 de março de 2021.

Alexandra Zugno

Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Relator – UNESC

Josiane Budni

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Interno – UNESC

Danielle Macedo

Profa. Dra. DANIELLE MACEDO
Membro Externo – UFC

Ives Cavalcante Passos

Prof. Dr. IVES CAVALCANTE PASSOS
Membro Externo – UFRGS



Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori
Orientadora



Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS