

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

CARLOS AUGUSTO PADOVAN MARINO

**A IMIPRAMINA INDUZ HIPERATIVIDADE EM RATOS SUBMETIDOS A
ADMINISTRAÇÃO DE OUABAINA: IMPLICAÇÕES PARA UM MODELO
ANIMAL DE VIRADA MANÍACA**

**CRICIÚMA
DEZEMBRO, 2019**

CARLOS AUGUSTO PADOVAN MARINO

**A IMIPRAMINA INDUZ HIPERATIVIDADE EM RATOS SUBMETIDOS A
ADMINISTRAÇÃO DE OUABAINA: IMPLICAÇÕES PARA UM MODELO
ANIMAL DE VIRADA MANÍACA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Samira S. Valvassori.

Co-orientador: Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA

DEZEMBRO, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M339i Marino, Carlos Augusto Padovan.

A imipramina induz hiperatividade em ratos submetidos a administração de ouabaína : implicações para um modelo animal de virada maníaca / Carlos Augusto Padovan Marino. - 2019. 39 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Samira da Silva Valvassori.

Coorientador: João Luciano de Quevedo.

1. Imipramina - Efeitos colaterais. 2. Transtorno bipolar. 3. Ouabaína. 4. Depressão. 5. Psicose maníaco-depressiva. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

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

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT 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, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.




UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 342

Com início às 15:30h (quinze horas e trinta minutos) do dia onze de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **CARLOS AUGUSTO PADOVAN MARINO** sob a orientação da **Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori** intitulada “**A IMIPRAMINA INDUZ HIPERATIVIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO DE OUABAÍNA: IMPLICAÇÕES PARA UM MODELO ANIMAL DE VIRADA MANÍACA**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Profa. Dra. Talita Tuon (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 16:30h (dezesesseis horas e trinta minutos), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 11 (onze) de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte).


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador PPGCS

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS


Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

RESUMO

O Transtorno Bipolar (TB) é conhecido por se tratar de um transtorno psiquiátrico grave e crônico, caracterizado por mudanças de humor, que se alternam entre mania e depressão. Os estabilizadores do humor e os antipsicóticos atípicos são eficazes no tratamento ou prevenção de episódios maníacos e hipomaníacos do TB. Entretanto, a eficácia dessas medicações nos episódios depressivos é limitada. Os antidepressivos são, portanto, comumente prescritos para o tratamento da depressão bipolar. A principal preocupação com o uso de antidepressivos no tratamento dessa condição é o risco de induzir uma mudança de depressão para hipomania ou mania, estado também conhecido como “virada maníaca”. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de imipramina sobre o comportamento do tipo maníaco e do tipo depressivo em ratos submetidos a injeção intracerebroventricular (ICV) de ouabaína (OUA). Para o presente estudo, foram utilizados 60 ratos Wistar machos adultos. Os animais foram primeiramente submetidos a uma cirurgia estereotáxica, onde uma cânula foi implantada no ventrículo lateral. Após a recuperação, os animais receberam uma única injeção ICV de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa). Do 9º ao 14º dia após a injeção ICV de OUA os animais receberam injeções intraperitoneais diárias de imipramina (IMI - 10mg/kg) ou salina. Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e do nado forçado 7, 9 e 14 dias após a administração ICV. No final de todas as avaliações comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia, o cérebro foi removido e dissecado em córtex frontal e hipocampo. A partir das estruturas cerebrais dissecadas foi avaliada a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. No teste do campo aberto, 7 dias após a administração de OUA pode-se observar comportamentos do tipo maníaco nos animais, através do aumento da atividade locomotora e da exploratória, bem como comportamentos estereotípicos nos ratos. Além disso, a OUA diminuiu a imobilidade, aumentou a natação e a escalada no teste do nado forçado. Nove dias após a administração de OUA, os animais não apresentaram comportamento do tipo maníaco e nem alterações no teste do nado forçado. Quatorze dias após a administração de OUA, os ratos não apresentavam comportamentos do tipo maníaco, mas, apresentavam comportamento do tipo depressivo, com aumento de imobilidade no teste do nado forçado. O tratamento com IMI reverteu o aumento da imobilidade e a diminuição da natação e da escalada induzidos pela OUA no teste do nado-forçado. Entretanto, a IMI induziu comportamento do tipo maníaco nos animais que haviam sido submetidos a administração ICV de OUA. Quatorze dias após a administração de OUA não foi observado alterações na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas. Em conclusão, a IMI, apesar de reverter comportamento do tipo depressivo induzidos por OUA, levou à comportamentos do tipo maníaco nos animais previamente submetidos a administração ICV de OUA. Sugere-se que a administração de IMI em ratos previamente submetidos a OUA é um modelo animal adequado para estudar os mecanismos envolvidos na virada-maníaca. Além disso, o modelo animal de TB induzido por OUA pode ser considerado um modelo relevante para a avaliar possíveis fármacos para o tratamento da depressão bipolar.

Palavras-Chave: Transtorno Bipolar; Depressão; Mania; Ouabaína; $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.

ABSTRACT

Bipolar Disorder (BD) is known to be a severe and chronic psychiatric disorder, characterized by mood swings alternating between mania and depression. Mood stabilizers and atypical antipsychotics are effective in treating or preventing manic and hypomanic episodes of TB. However, the effectiveness of these medications in depressive episodes is limited. Antidepressants are therefore commonly prescribed for the treatment of bipolar depression. The primary concern with the use of antidepressants to treat this condition is the risk of inducing a change from depression to hypomania or mania, a condition also known as a "manic upset." The aim of the present study was to evaluate the effects of imipramine on manic and depressive behavior in rats submitted to intracerebroventricular injection (ICV) of ouabain (OAU). For the present study, 60 adult male Wistar rats were used. The animals were first submitted to stereotactic surgery, where a cannula was implanted in the lateral ventricle. After recovery, the animals received a single ICV injection of OAU or artificial cerebrospinal fluid (ACSF). From the 9th to the 14th day after ICV OAU injection, the animals received daily intraperitoneal injections of imipramine (IMI - 10mg / kg) or saline. The animals underwent open field and forced swimming testing 7, 9 and 14 days after ICV administration. At the end of all behavioral assessments, the animals were euthanized; the brain was removed and dissected into the frontal cortex and hippocampus. From the dissected brain structures the activity of Na + K + ATPase was evaluated. In the open field test, 7 days after OAU administration, manic behaviors can be observed in animals, through increased locomotor and exploratory activity, as well as stereotypic behaviors in rats. In addition, the OAU decreased immobility, increased swimming and forced swim climbing. Nine days after OAU administration, the animals showed no manic-like behavior and no changes in the forced swimming test. Fourteen days after the administration of OAU, the rats did not exhibit manic-like behaviors, but rather depressed-like behavior, with increased immobility in the forced swim test. IMI treatment reversed the increase in immobility and decreased OAU-induced swimming and climbing in the forced swim test. However, IMI induced manic behavior in animals that had undergone ICA administration of OAU. Fourteen days after OAU administration, no changes in Na + K + ATPase activity were observed in any of the brain structures evaluated. In conclusion, IMI, despite reversing OAU-induced depressive-type behavior, led to manic-type behavior in animals previously submitted to OAU ICV administration. It is suggested that the administration of IMI in rats previously submitted to OAU is an appropriate animal model to study the mechanisms involved in manic turn. In addition, the animal model of OA-induced TB can be considered a relevant model to evaluate possible drugs for the treatment of bipolar depression.

Keywords: Bipolar Disorder; Depression; Mania; Ouabain; Na+ K+-ATPase.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DO TRANSTORNO BIPOLAR	8
1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TRANSTORNO BIPOLAR	9
1.2.1 Virada Maníaca	10
1.3 ALTERAÇÕES DA BOMBA DE SÓDIO-POTÁSSIO (Na ⁺ /K ⁺ -ATPase)	11
1.4 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR OUABAÍNA	12
1.5 JUSTIFICATIVA	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 ANIMAIS	15
3.2 CIRÚRGIA ESTEREOTÁXICA	15
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO	15
3.4 TESTE DO CAMPO ABERTO	17
3.5 TESTE DE NADO FORÇADO	17
3.6 COLETA DE AMOSTRAS CEREBRAIS	17
3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA Na ⁺ K ⁺ ATPase	18
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXOS	39
ANEXO I	40

INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DO TRANSTORNO BIPOLAR

O Transtorno Bipolar (TB) é conhecido por se tratar de um transtorno psiquiátrico grave e crônico. Os pacientes bipolares, geralmente, apresentam déficits cognitivos e funcionais graves, prejudicando o indivíduo em aspectos psicológicos e sociais. Além disso o TB causa um impacto negativo grave na qualidade de vida dos pacientes, bem como de seus familiares (Fernandes et al., 2018).

A epidemiologia demonstra que o TB é um desafio no que tange o seu diagnóstico, o seu tratamento e a prevenção da incapacidade, atingindo aproximadamente 2-2,5% da população (Rowland e Marwaha, 2018). Pesquisas epidemiológicas de base populacional têm sido realizadas nas últimas décadas, proporcionando informações valiosas sobre frequência, fatores de risco, incapacidade social e utilização de Serviços de Saúde, buscando descrever a fenomenologia do TB (Pereira et al., 2010). As evidências epidemiológicas devem conceder uma medida de magnitude do transtorno, sua distribuição na população bem como os fatores de risco que as promovem. Os autores mencionam que estudos epidemiológicos realizados, não observaram diferenças significativas na incidência entre os sexos no TB I e II (Kapczinski e Quevedo, 2015). O TB trata-se de um transtorno que possui forte herança genética, sendo mais prevalente em parentes de primeiro grau (Villa, 2012). Segundo Moreno et al. (2016), a alta herdabilidade vem sendo demonstrada em estudos recentes, sendo que este transtorno possui probabilidade 10 vezes maior de ocorrer em parentes de primeiro grau do que na população geral.

Esse transtorno caracteriza-se por mudanças patológicas de humor, seguido de um determinado período de remissão. A seriedade dos episódios varia e pode manifestar-se como mania, depressão e/ou episódios mistos (Gigante et al., 2016). O marco clínico no diagnóstico do TB é a presença de episódios maníacos ou hipomaníaco. Durante um episódio maníaco o paciente apresenta o humor elevado, expansivo ou irritável e, de acordo com os critérios para o diagnóstico, esta alteração do humor deve durar pelo menos uma semana - ou menos, caso a hospitalização seja exigida. O episódio depressivo presente no TB revela ao paciente sintomas de tristeza, desespero e/ou angústia, anedonia, mudança de peso, perturbações do sono, agitação ou retardo psicomotor, baixa concentração e ideação suicida (American Psychiatry Association, 2013). Do ponto de vista clínico, a depressão afeta a forma de pensar, agir, e ser do indivíduo,

e deve ser encarada como um problema de saúde que afeta não só o cérebro e o estado psicológico, mas também todo organismo (Pereira et al., 2010).

Conforme critérios citados pelos autores Pereira et al. (2010), o TB faz parte dos transtornos do Eixo I e é classificado em TB I e TB II, além do Transtorno Ciclotímico. Conceituando estes tipos de TB, entende-se que no TB I, ocorre um ou mais episódios maníacos ou mistos, geralmente, seguidos por episódios depressivos. No TB-II, além de ocorrer episódios depressivos, estes são acompanhados por, no mínimo, um episódio hipomaníaco. Já no Transtorno Ciclotímico, são necessários, pelo menos, dois anos com numerosos períodos de sintomas depressivos que não preenchem critérios para depressão maior. Além disso, têm-se os episódios mistos, nos quais há presença de sintomas de mania, de hipomania e de depressão, que se apresentam simultaneamente.

O TB é considerado um transtorno muito complexo, com acometimento gradual do cérebro, bem como da saúde geral do indivíduo como num todo (Kapczinski et al., 2017). De acordo com os estudos prévios, observa-se que, o TB começa durante um período denominado “período de risco” e estende-se do primeiro episódio de humor até o estágio final da patologia, onde os sintomas são mais crônicos, difusos e resistentes ao tratamento. Tais sintomas são proporcionados por alterações cerebrais relacionadas à ação de mediadores neurotóxicos e redução do suporte neurotrófico e neuroprotetor. A gravidade dos sintomas clínicos, comprometimento cognitivo e deterioração funcional, exigem alternativas de tratamento mais complexas e caras. Nessa perspectiva, a prevenção da progressão do TB é fundamental para reduzir o importante impacto econômico, psicossocial e funcional desse transtorno em pacientes, famílias e sociedade (Brietzke et al., 2016).

1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TRANSTORNO BIPOLAR

O Lítio (Li) é o medicamento mais utilizados no tratamento do TB, sendo também o mais antigo entre os fármacos de tratamento (Won e Kim, 2017). Entretanto, Miller (2016) cita que embora o lítio tenha bons resultados no TB, os antipsicóticos podem ter início de ação mais rápida na mania; logo, podem ser mais efetivos inicialmente, como na primeira semana de tratamento, especialmente em pacientes gravemente doentes, agitados ou com sintomas psicóticos proeminentes.

Outros medicamentos comumente indicados são o ácido valpróico (VPA) e a carbamazepina, assim como os anticonvulsivantes: a lamotrigina, topiramato, gabapentina, oxycarbazepina), os antipsicóticos atípicos: aripiprazol, clozapina, olanzapina, quetiapina,

risperidona, ziprazidona, e, os antidepressivos: inibidores da monoaminooxidase – IMAO; tricíclicos; inibidores seletivos da recapitação da serotonina – ISRS (McCormick et al., 2015).

A farmacoterapia no TB tem papel decisivo e inquestionável e é realizada, tanto aguda quanto profilaticamente, principalmente, com estabilizadores do humor. Entretanto, uma grande quantidade dos pacientes tem recorrência de episódios do humor durante a vida, mesmo em uso da medicação adequada (Azorin, 2012). Estudos demonstraram que 40% dos pacientes em tratamento apresentaram recaídas em um ano e 73% apresentaram recaídas em cinco anos. Sabe-se que as recaídas pioram a evolução do transtorno, aumentando a ocorrência de novos episódios, diminuindo o intervalo entre estes e piorando o funcionamento psicossocial (Kapczinski et al., 2008).

1.2.1 Virada Maníaca

Estabilizadores do humor (como Li, VPA e carbamazepina) e antipsicóticos atípicos são eficazes no tratamento ou prevenção de episódios maníacos e hipomaníacos no TB. Entretanto, com exceção da quetiapina, lurasidona e olanzapina, a eficácia dessas medicações nos episódios depressivos é limitada. Os antidepressivos são, portanto, comumente prescritos e constituem 50% de todos os medicamentos psicotrópicos prescritos para o tratamento do TB (Baldessarini et al., 2007; Antosik-Wójcińska et al., 2015). É importante salientar que, diferentemente da depressão unipolar, poucos estudos têm avaliado adequadamente os efeitos dos antidepressivos na depressão bipolar, sendo que o uso dos antidepressivos no TB permanece controverso. De fato, nem a Agência Europeia de Medicamentos nem a *Food and Drug Administration* dos E.U.A. aprovaram qualquer antidepressivo padrão como monoterapia para a depressão bipolar (McIntyre et al., 2013).

A principal preocupação com o uso de antidepressivos no tratamento da depressão bipolar é o risco de induzir uma mudança de depressão para hipomania ou mania, estado também conhecido como “virada maníaca” (Allain et al., 2017). Um estudo clínico prévio demonstrou que a virada maníaca tem sido associada a um pior prognóstico em longo prazo (Maj et al., 2002). Além disso, alguns estudos relataram uma associação entre o tratamento antidepressivo e o aumento da ciclagem de humor em pacientes bipolares (Viktorin et al., 2014; Gorwood et al., 2016).

A virada maníaca induzida por antidepressivos têm sido discutidas desde que os antidepressivos tricíclicos foram introduzidos na década de 1950, sendo que desde o início foi observado que os tricíclicos poderiam aumentar o risco de elevação anormal do humor (Ball e

Kiloh, 1959). Desde então, vários estudos sobre os efeitos dos antidepressivos em episódios depressivos do TB foram conduzidos, e alguns encontraram associações entre antidepressivos e virada maníaca ou hipomaníaca (Allen et al., 2017; Villa et al., 2012), enquanto outros não (Angst, 1982; Visser, 2005). Embora dados sejam discutivelmente inconclusivos, as diretrizes atuais de tratamento da depressão bipolar refletem um consenso relativamente amplo de que o tratamento antidepressivo pode induzir a mania e desencorajam o uso da monoterapia antidepressiva. Muitas diretrizes recomendam o uso de antipsicóticos atípicos ou estabilizadores de humor como primeira linha de tratamento para episódios depressivos. As diretrizes diferem em relação aos tratamentos de segunda linha (e diferenças regionais também podem ser observadas) (Nivoli et al., 2011), embora alguns endossem o uso de antidepressivos em combinação com agentes antimaníacos, particularmente se usados por períodos limitados.

Alguns estudos demonstraram se o uso concomitante de um estabilizador de humor durante o tratamento com antidepressivos pode prevenir a virada maníaca. Entretanto, estes trabalhos são influenciados por prescrição incorreta de fármacos, sendo assim, apresentam resultados insuficientes e inconsistentes (Boerlin et al., 1998; Bottlender et al., 2001; Young et al., 2000). Além disso, uma metanálise concluiu que os estabilizadores de humor não foram eficazes na prevenção da virada maníaca (Tondo et al., 2010).

1.3 ALTERAÇÕES DA BOMBA DE SÓDIO-POTÁSSIO (Na^+/K^+ -ATPase)

Disfunções na regulação de íons têm sido identificadas em pacientes bipolares. Concentrações elevadas de íons de cálcio foram encontradas em plaquetas e em linfócitos de pacientes com mania e depressão bipolar (Dubovsky et al., 1994). Além disso, tem sido sugerido que os episódios de humor (mania e depressão) do TB estão associados ao aumento intracelular de Na^+ (Coppin et al., 1966). Juntos, estes estudos sugerem que a diminuição do transporte de íons através da membrana pode estar envolvida neste transtorno.

A Na^+K^+ -ATPase é uma enzima eletrogênica, transmembrana, ativada por adenosina trifosfatase (ATP), e tem como função primária a regulação dos níveis de sódio e potássio intracelulares, a fim de manter o potencial de membrana (Larsen et al., 2016). A Na^+K^+ -ATPase é formada por subunidades α e β (Geering, 2008), sendo que o Na^+ se liga a subunidade α - a qual tem três sítios de ligação para o Na^+ - enquanto uma alteração conformacional da subunidade β gera um sítio de ligação ativo para o ATP. Então, o ATP é hidrolisado, dando origem ao ADP e a molécula de fosfato restante se liga a subunidade β , resultando em energia que é usada para bombear Na^+ para o interior da célula. Após, dois íons

K^+ se ligam a subunidade β e a molécula de fosfato é liberada, que por sua vez se liga ao ADP que retorna a sua forma de ATP. Assim, a Na^+K^+ -ATPase transporta três íons de Na^+ para fora e dois íons de K^+ para dentro da célula (Larsen et al., 2016).

Em uma metanálise, Looney e El-Mallakh (1997) demonstraram diminuição da Na^+K^+ -ATPase em eritrócitos de pacientes bipolares, tanto na fase maníaca quanto na fase depressiva, quando comparados com os pacientes que estavam em eutimia. Além disso, outro estudo avaliou vários aspectos de resposta à Na^+K^+ -ATPase, como transcrição, tradução, atividade e concentração intracelular de íons, em células linfoblásticas de pacientes bipolares e de controles saudáveis. Neste estudo, os pesquisadores observaram que, ao contrário dos controles, as células derivadas de pacientes bipolares não alteram os parâmetros de resposta ao transporte de Na^+ e, conseqüentemente, possuem uma alta concentração de Na^+ no meio intracelular (Li e El-Mallakh, 2004). A partir desses estudos, podemos sugerir que alterações na enzima Na^+K^+ -ATPase podem ser uma hipótese atrativa para explicar, pelo menos em parte, a fisiopatologia do TB.

1.4 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR OUABAÍNA

A ouabaína (OUA) é um inibidor da Na^+K^+ -ATPase e quando administrada em roedores, os animais apresentam sintomas do tipo maníaco, incluindo hiperatividade, comportamento de risco e movimentos estereotípicos (Dal-Pont et al., 2018). Isso porque, a OUA ao inibir a Na^+K^+ -ATPase, faz com que a célula demore a voltar ao potencial de repouso, deixando o neurônio hiper excitado (McCarren and Alger, 1987). Portanto, uma teoria atrativa para explicar os episódios maníacos do TB seria que essa diminuição da atividade da Na^+K^+ -ATPase, que é observada nos pacientes, possa estar aumentando a hiperexcitação neuronal, levando à presença dos sintomas dos episódios maníacos. Entretanto, como já foi descrito anteriormente, a diminuição da Na^+K^+ -ATPase também foi observada durante os episódios depressivos. Não existem muitos estudos que explicam mais detalhadamente o papel da inibição da atividade da Na^+K^+ -ATPase na depressão bipolar. Entretanto, tem sido sugerido que a inibição duradoura da atividade desta enzima, que aumenta a excitabilidade celular e diminui o controle da repolarização neuronal, pode diminuir a velocidade de recuperação neuronal e, conseqüentemente, diminuir também a eficiência sináptica dos neurônios, levando aos episódios depressivos do TB (Lichtstein et al., 2018).

É importante destacar que tanto estudos clínicos quanto pré-clínicos têm associado as alterações da Na^+/K^+ -ATPase a outros eventos bioquímicos e moleculares observados no

TB, como aumento de estresse oxidativo e diminuição de fatores neurotróficos (Jornada et al., 2010; 2011). Isso torna a alteração da Na^+/K^+ -ATPase no TB uma hipótese ainda mais interessante para explicar a etiologia/fisiopatologia do TB.

A administração de OUA em ratos, além de induzir hiperatividade, parece induzir também hipoatividade, que pode ser considerado um sintoma do tipo depressivo. Além disso, um estudo pré-clínico prévio demonstrou que sete dias após a administração de OUA, induz comportamento do tipo maníaco nos roedores, como também, comportamento de risco e hiperatividade. Entretanto, 14 dias após a administração dessa substância, pode induzir comportamentos do tipo depressivo, como aumento da imobilidade no teste do nado forçado e diminuição do consumo de alimento doce (Valvassori et al., 2015b). Ambos os sintomas induzidos pela OUA são prevenidos pela administração de Li (Jornada et al., 2011; Valvassori et al., 2015b).

Ellenbroek e Cools (1990) descreveram previamente os critérios necessários para considerar um modelo animal em transtorno psiquiátrico válido. Entre estes se encontram: mimetizar os sintomas do determinado transtorno (validade de face); reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos do transtorno (validade de construção); os fármacos usados no tratamento do transtorno devem reverter os sintomas induzidos no modelo animal (validade preditiva) (Razafsha et al., 2013). Portanto, a administração de OUA em ratos parece ser um bom modelo animal de transtorno bipolar, pois mimetiza os dois polos de humor, mimetiza o tratamento farmacológico e alterações fisiopatológicas, todos observados neste transtorno (Herman et al., 2007).

1.5 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a gravidade do TB, pouco que sabe sobre sua fisiopatologia. Devido à dificuldade no seu tratamento, pois a maioria deles visa tratar apenas os sintomas, há a necessidade de novos alvos terapêuticos para o TB. Dada a necessidade de tratamentos eficazes para episódios depressivos no transtorno bipolar, é de grande importância clínica esclarecer se os antidepressivos aumentam o risco de episódios maníacos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da IMI sobre o comportamento do tipo maníaco e do tipo depressivo em ratos submetidos a injeção ICV de OUA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da IMI sobre a atividade locomotora e exploratória, comportamento de risco e estereotipia, no teste do campo aberto, em ratos submetidos a injeção ICV de OUA;

Avaliar os efeitos da IMI sobre a imobilidade, natação e escalada, no teste de nado forçado, em ratos submetidos a injeção ICV de OUA;

Avaliar os efeitos da IMI sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a injeção ICV de OUA;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para o presente estudo, foram utilizados 60 ratos Wistar machos adultos, pesando entre 250 e 350 g, obtidos na colônia de reprodução da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram alojados em cinco por gaiola com comida e água disponíveis *ad libitum* e foram mantidos em um ciclo de 12 horas claro/escuro (luzes acediam às 6:00 da manhã) a uma temperatura de 22 ± 1 °C. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com a aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo 101/2019-1. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados.

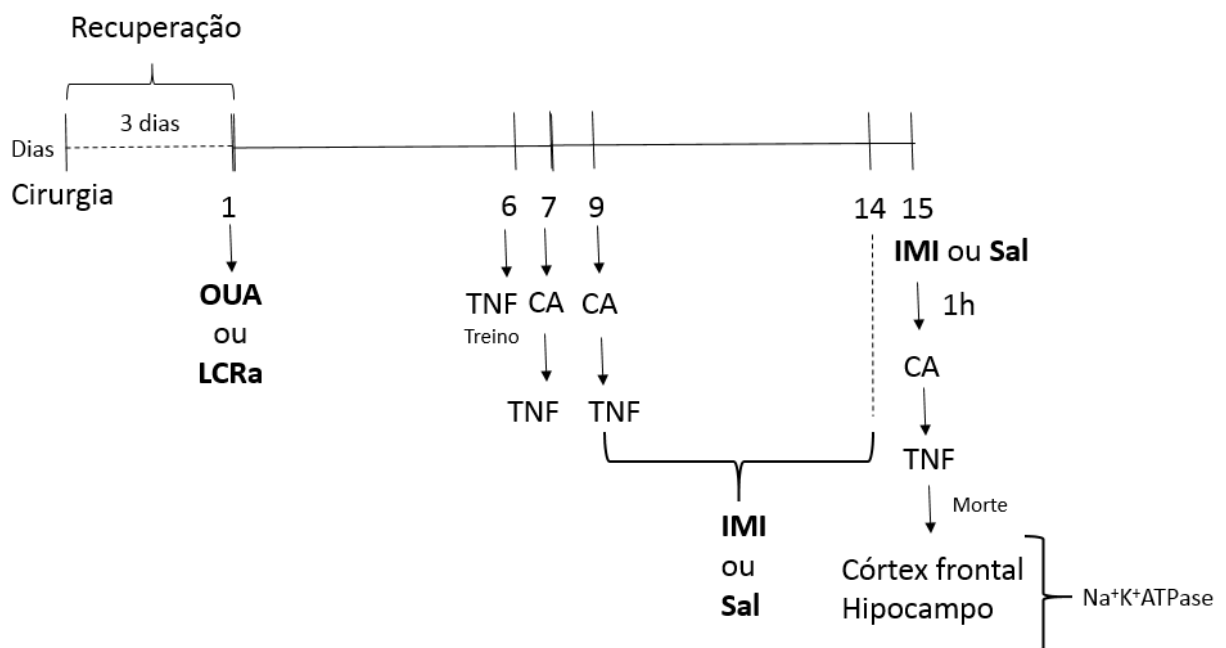
3.2 CIRÚRGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados via intramuscular com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Em um aparelho estereotáxico, a pele do crânio do rato foi removida e uma cânula guia de 9 mm de calibre 27 foi colocada à 0,9 mm posterior ao bregma, 1,5 mm a partir da linha média e 1,0 mm acima do ventrículo lateral do cérebro. Através de um orifício de 2mm feito no osso craniano, foi implantada uma cânula de 2,6 mm ventral à superfície superior do crânio e fixada com cimento acrílico dentário. Os animais passaram por um período de recuperação de três dias após a cirurgia.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

Após a recuperação, os animais receberam uma única injeção intracerebroventricular (ICV) de 5µl de OUA 10^{-3} M dissolvida em líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa) ou 5 µl de LCRa. Uma cânula de calibre 30 foi colocada dentro da cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma micro-seringa. A ponta da cânula de infusão se projetava 1,0 mm através da cânula guia, visando o ventrículo lateral direito do cérebro. Do dia 9 ao 15, após a administração ICV, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) diárias de imipramina (IMI - 10 mg/Kg, 1mL/Kg) ou solução salina (Sal - 0,09% NaCl - 1mL/Kg).

Para um melhor entendimento do desenho experimental, segue abaixo a linha do tempo de todo o experimento (**Esquema 1**). Os ratos foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a implantação de uma cânula no ventrículo lateral. Os animais se recuperaram da cirurgia durante três dias. Após a recuperação os animais receberam uma única injeção ICV de OUA ou LCRa. Nos dias 7, 9 e 15, após a injeção ICV, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. Nos dias 6, 7, 9 e 15 após a administração ICV, os animais foram submetidos ao nado-forçado, sendo que no dia 6 os animais foram treinados para este teste e nos dias 7, 9 e 15 os animais foram testados. No dia 9 os animais foram primeiramente submetidos aos testes comportamentais e, imediatamente após, começaram a receber injeção i.p. de IMI ou Sal, as quais foram administradas uma vez por dia e permaneceram até o dia 15. No dia 15, os animais receberam IMI ou Sal e 1h após foram submetidos ao teste do campo aberto e, em seguida, ao teste do nado-forçado. Após o último teste comportamental os animais foram submetidos à eutanásia, o cérebro foi removido e dissecado em córtex frontal e hipocampo para posterior análise da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.



Esquema 1: Desenho experimental e tratamento. OUA = ouabaína. LCRa = líquido cefalorraquidiano artificial. IMI = imipramina. Sal = salina. TNF = teste do nado forçado. CA = Campo aberto. Fonte: Do autor, 2019.

3.4 TESTE DO CAMPO ABERTO

Nos dias 7, 9 e 15, após a administração ICV de OUA ou LCRa, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (**ver esquema 1**). Neste teste, os animais foram colocados em uma arena de madeira (40x60cm) cercados por paredes de madeira de 50cm de altura, que continha um vidro frontal. O assoalho da arena era dividido em nove quadrantes iguais com linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante posterior esquerdo e depois deixados para explorar a arena livremente durante 5 min. Atividade locomotora e exploratória foram avaliadas, através do número de cruzamentos e levantamentos dos animais durante o teste. O comportamento de risco foi avaliado através do tempo que o animal ficou no quadrante central. O comportamento estereotípico foi avaliado através do tempo de autolimpeza e do tempo de limpeza das vibrissas.

3.5 TESTE DE NADO FORÇADO

O teste de nado forçado foi realizado como descrito por Porsolt et al. (1977). O teste envolve exposições a um tanque cilíndrico cheio de água, no qual os ratos não conseguem tocar no fundo do tanque ou escapar. O tanque é feito de acrílico transparente, com 80 cm de altura, 30 cm de diâmetro e preenchido com água (22 – 26 °C) até uma profundidade de aproximadamente 40 cm. No dia 6, após a injeção de OUA ou de LCRa, os ratos foram colocados individualmente no cilindro contendo água por 15 min (sessão de treino) (**ver esquema 1**). Nos dias 7, 9 e 14, imediatamente após o teste de campo aberto, os ratos foram novamente submetidos ao teste de nado forçado, durante 5 minutos (sessões de teste). O tempo de imobilidade, de escalada e de nado dos ratos foi registrado em segundos por um observador especialista (o pesquisador estará cego para os grupos experimentais).

3.6 COLETA DE AMOSTRAS CEREBRAIS

Imediatamente após o último teste comportamental, os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi removido e dissecado em córtex frontal e hipocampo. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para análise da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.

3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA Na⁺K⁺ATPase

O reagente utilizado para a avaliação da atividade da Na⁺ K⁺ -ATPase continha 5,0 mM de MgCl₂, 80,0 mM de NaCl, 20,0 mM de MKCl e 40,0 mM de Tris – HCl, pH 7,4, em um volume final de 200 µL. A reação foi iniciada pela adição de ATP em uma concentração final de 3,0 mM. Os controles foram realizados sob as mesmas condições com a adição de 1,0 mM de ouabaína. A atividade da Na⁺ K⁺ -ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios, de acordo com o método de Wyse e colaboradores (2000). O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi medido pelo método de Chan e colaboradores (1986). A atividade específica da enzima foi expressa como nmol de Pi liberado por min por mg de proteína.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi verificado que a distribuição dos dados era do tipo normal. Portanto, os dados estão apresentados no formato de gráficos que representam a média e desvio padrão da média. A diferença entre as médias foi calculada através do teste T para amostras independentes em todas as análises feitas 7 e 9 dias após a administração ICV, pois continham apenas dois grupos experimentais. Para os experimentos feitos 15 dias após a administração ICV, as diferenças entre as médias foram calculadas através da análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey. Em todas as comparações, a significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados para o número de cruzamentos e levantamentos no teste do campo aberto, sete, nove e quinze dias após a injeção ICV de OUA estão descritos na Figura 1. A administração de OUA aumentou tanto o número de cruzamentos quanto o número de levantamentos sete dias após sua injeção (Figura 1A e 1D). Nenhuma alteração foi observada nesses dois parâmetros 9 dias após a administração de OUA (Figura 1B e 1E). 15 dias após a injeção ICV, a OUA também não causou alteração nesses parâmetros, quando comparada ao grupo controle. Entretanto, quando tratados com IMI, os animais que receberam ICV de OUA apresentaram um aumento significativo no número de cruzamentos e levantamentos. Vale ressaltar que a administração da mesma dose de IMI *per se* não induziu nenhuma alteração desses parâmetros (Figura 1C e 1F).

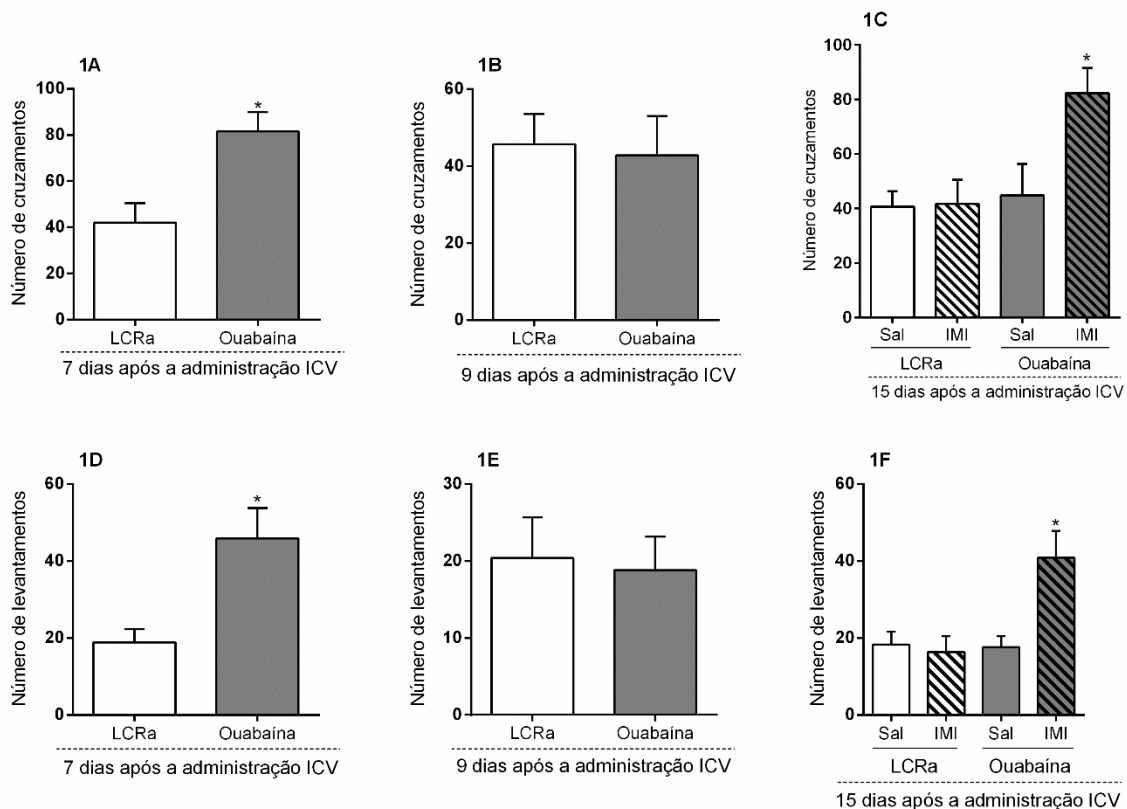


Figura 1: Efeitos da administração de ouabaina (OUA) *per se* ou associada ao tratamento com imipramina (IMI) sobre o número de cruzamentos (A, B e C) e levantamentos (D, E e F) no teste de campo aberto 7, 9 e 15 dias após a administração de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo controle de acordo com o teste t de student (7 e 9 dias) ou ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Tukey (15 dias). Dados do teste T para 7 dias após a injeção ICV de OUA [cruzamentos: $p < 0,001$; levantamentos: $p < 0,001$]; para 9 dias após a injeção ICV [cruzamentos: $p = 0,371$; levantamentos: $p < 0,370$]. Dados do ANOVA de duas vias para a administração de OUA 15 dias [cruzamentos: $F(1,28) = 52,280$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(1,28) = 53,9090$, $p < 0,001$]; para o tratamento com IMI [cruzamentos: $F(1,28) = 35,736$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(1,28) = 43,2103$, $p < 0,001$] e para a interação entre OUA e IMI [cruzamentos: $F(1,28) = 32,120$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(1,28) = 59,7017$, $p < 0,001$].

A figura 2 representa o número de visitas ao centro do campo aberto sete, nove e 15 dias após a injeção ICV de OUA. A OUA foi capaz de aumentar o número de visitas ao centro da arena sete dias após a sua injeção (Figura 2A). Entretanto, um efeito oposto foi observado nove dias após a administração, onde a OUA diminuiu significativamente o número de visitas ao centro quando comparado ao grupo controle (Figura 2A). Quinze dias após a injeção ICV, o grupo que recebeu apenas ICV de OUA não apresentou diferença, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, os animais que receberam OUA e foram tratados com IMI apresentaram aumento significativo no número de visitas ao centro. É importante ressaltar que a administração de IMI no grupo LCRa não causou nenhuma alteração nesse parâmetro comportamental (Figura 2C).

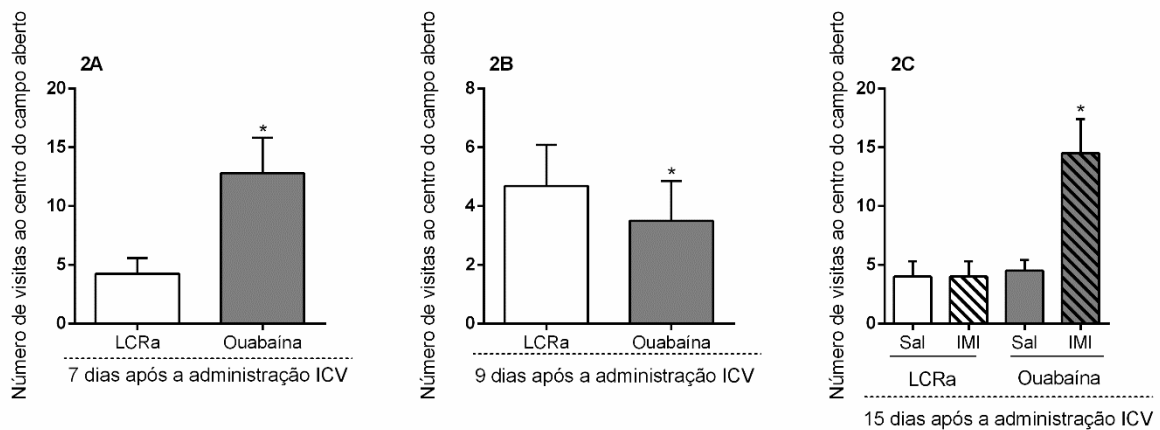


Figura 2: Efeitos da administração de ouabaína (OUA) *per se* ou associada ao tratamento com imipramina (IMI) sobre o número de visitas ao centro do campo aberto 7 (A), 9 (B) e 15 (C) dias após a administração de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa). As barras representam média \pm erro padrão; $*$ = $p < 0,05$ comparado com o grupo controle de acordo com o teste t de student (7 e 9 dias) ou ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Tukey (15 dias). Dados do teste T para 7 dias após a injeção ICV de OUA: [$p < 0,001$]; para 9 dias após a injeção ICV: [$p = 0,021$]. Dados do ANOVA de duas vias para a administração de OUA 15 dias [$F(1,28) = 75,2889$, $p < 0,001$]; para o tratamento com IMI [$F(1,28) = 62,2222$, $p < 0,001$] e para a interação entre OUA e IMI [$F(1,28) = 62,222$, $p < 0,001$].

A figura 3 representa o tempo de limpeza das vibrissas e o tempo de auto-limpeza dos animais durante o teste do campo aberto. Foi possível observar um aumento significativo desses dois parâmetros sete dias após a injeção ICV de OUA (Figura 3A e 3D). Entretanto, nove dias após a injeção ICV, não houve diferença no tempo de limpeza entre os grupos OUA e LCRa (Figura 3B e 3D). 15 dias após a administração, o grupo que recebeu ICV de OUA continuou não apresentando diferença, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, quando tratados com IMI, os animais que haviam recebido a administração de OUA apresentaram um aumento significativo no tempo de limpeza das vibrissas (Figura 3C) e de auto-limpeza (Figura 3F) comparados ao grupo controle. Vale ressaltar que a administração de IMI no grupo controle não causou nenhuma alteração.

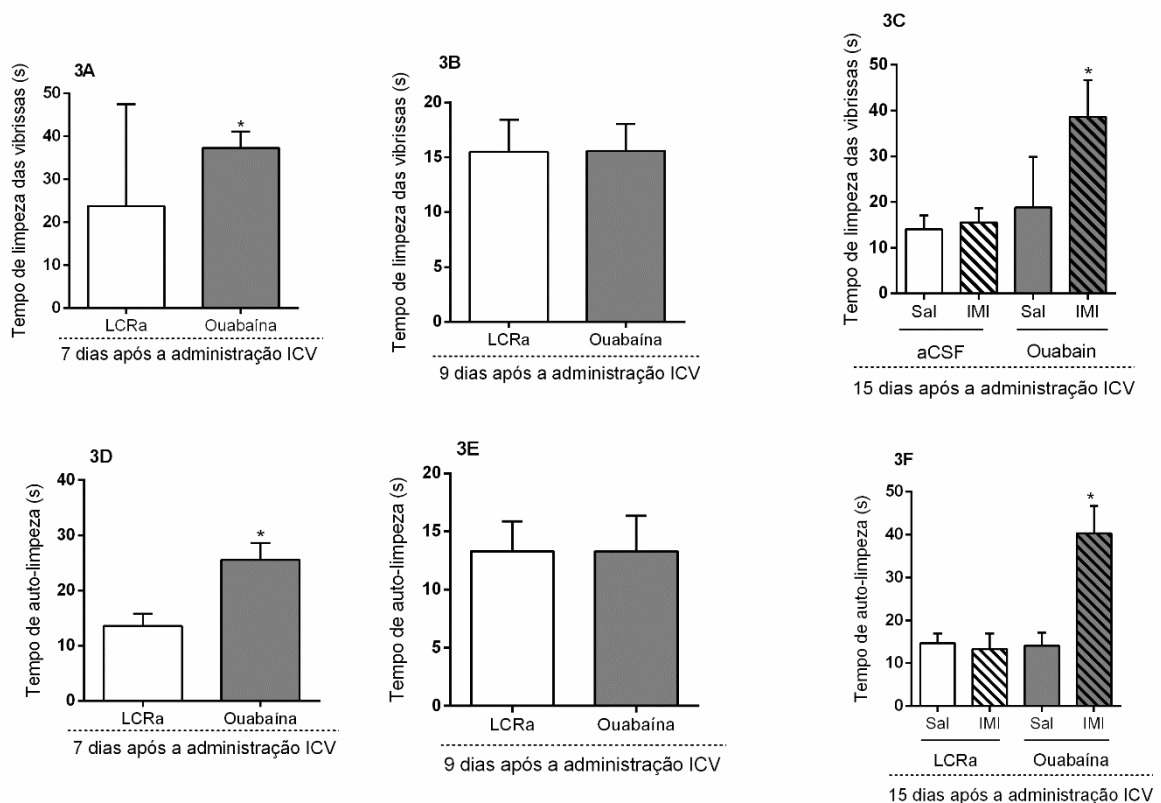


Figura 3: Efeitos da administração de ouabaína (OUA) *per se* ou associada ao tratamento com imipramina (IMI) sobre o tempo de limpeza das vibrissas (A, B e C) e de auto-limpeza (D, E e F) no teste de campo aberto 7, 9 e 15 dias após a administração de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo controle de acordo com o teste t de student (7 e 9 dias) ou ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Tukey (15 dias). Dados do teste T para 7 dias após a injeção ICV de OUA [vibrissas: $p = 0,032$; auto-limpeza: $p < 0,001$]; para 9 dias após a injeção ICV [vibrissas: $p = 0,912$; auto-limpeza: $p < 0,981$]. Dados do ANOVA de duas vias para a administração de OUA 15 dias [vibrissas: $F(1,28) = 29,9907$, $p < 0,001$; auto-limpeza: $F(1,28) = 81,0206$, $p < 0,001$]; para o tratamento com IMI [vibrissas: $F(1,28) = 17,6616$, $p < 0,001$; auto-limpeza: $F(1,28) = 71,6795$, $p < 0,001$] e para a interação entre OUA e IMI [vibrissas: $F(1,28) = 13,0139$, $p = 0,001$; auto-limpeza: $F(1,28) = 89,1210$, $p < 0,001$].

Os resultados do teste de nado forçado estão representados na figura 4. A administração de OUA foi capaz de induzir uma redução do tempo de imobilidade e aumento do tempo de natação e escalada, quando comparado ao grupo controle sete dias após a injeção ICV (Figura 4A, 4D e 4G respectivamente). Nove dias após a administração de OUA não foi possível observar nenhuma alteração nesses três parâmetros (Figura 4B, 4E e 4H). 15 dias após a injeção ICV, os animais que receberam OUA apresentaram aumento no tempo de imobilidade e diminuição no tempo de natação. O tratamento com IMI foi capaz de reverter essas alterações induzidas pela OUA, além de aumentar o tempo de escalada quando comparado com o grupo controle. A injeção de IMI *per se* também causou uma redução no tempo de imobilidade e aumento no tempo de natação dos animais (Figura 4C, 4F e 4I).

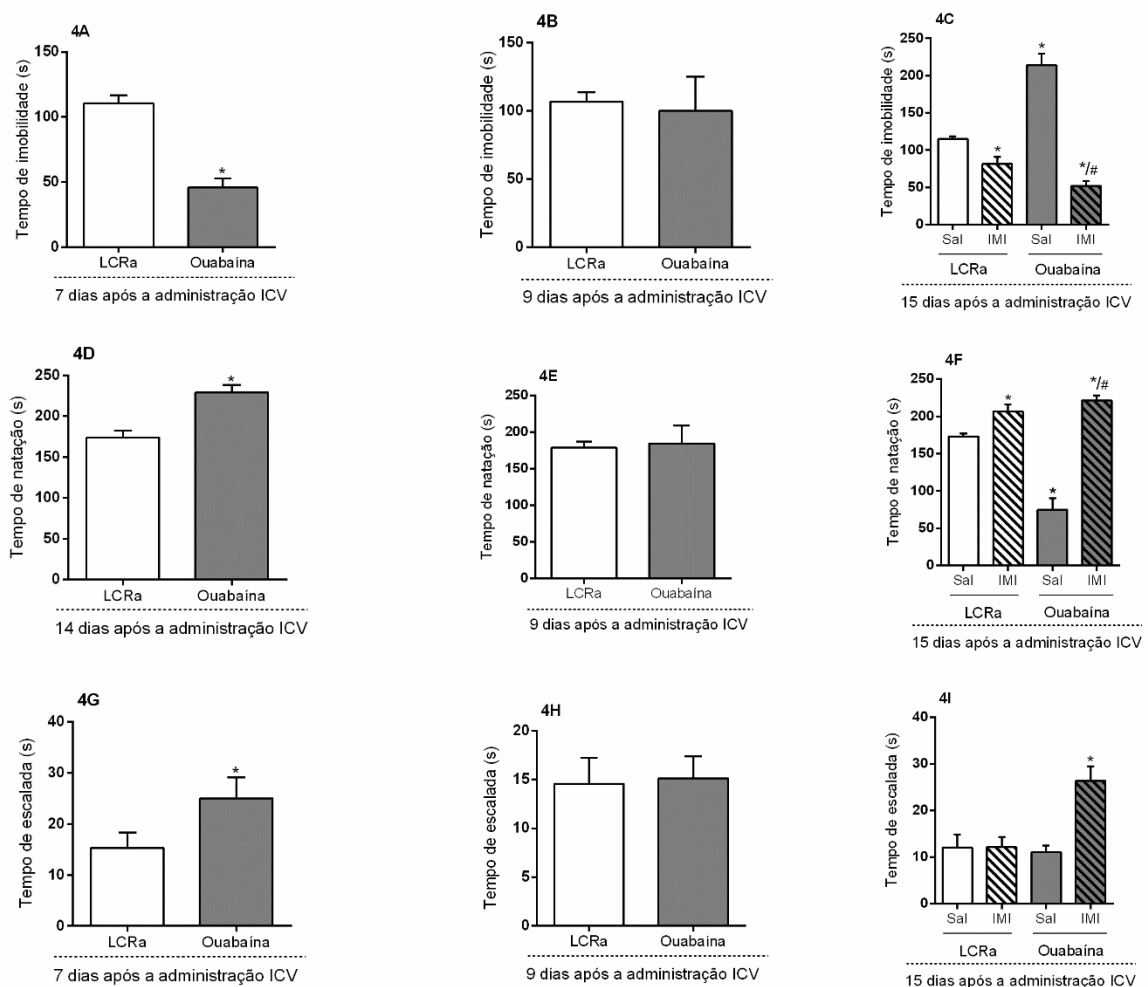


Figura 4: Efeitos da administração de ouabaína (OUA) per se ou associada ao tratamento com imipramina (IMI) sobre o tempo de imobilidade (A, B e C) e natação (D, E e F) e escalada (G, H e I) no teste de nado forçado 7, 9 e 15 dias após a administração de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo controle de acordo com o teste t de student (7 e 9 dias) ou ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Tukey (15 dias). Dados do teste T para 7 dias após a injeção ICV de OUA [imobilidade: $p < 0,001$; natação: $p < 0,001$; escalada: $p < 0,001$]; para 9 dias após a injeção ICV [imobilidade: $p = 0,302$; natação: $p = 0,337$; escalada: $p < 0,505$]. Dados do ANOVA de duas vias para a administração de OUA 15 dias [imobilidade: $F(1,28) = 107,187$, $p < 0,001$; natação: $F(1,28) = 140,390$, $p < 0,001$];

escalada: $F(1,28)=57,474$, $p<0,001$]; para o tratamento com IMI [imobilidade: $F(1,28)=835,017$, $p<0,001$; natação: $F(1,28)=658,667$, $p<0,001$; escalada: $F(1,28)=77,637$, $p<0,001$] e para a interação entre OUA e IMI [imobilidade: $F(1,28)=361,143$, $p<0,001$; natação: $F(1,28)=260,587$, $p<0,001$; escalada: $F(1,28)=76,927$, $p<0,001$].

A figura 5 representa a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ no córtex frontal (Figura 5A) e hipocampo (Figura 5B) 15 dias após a administração ICV do OUA. Nenhuma alteração significativa foi observada na atividade desta enzima, em ambas as estruturas cerebrais.

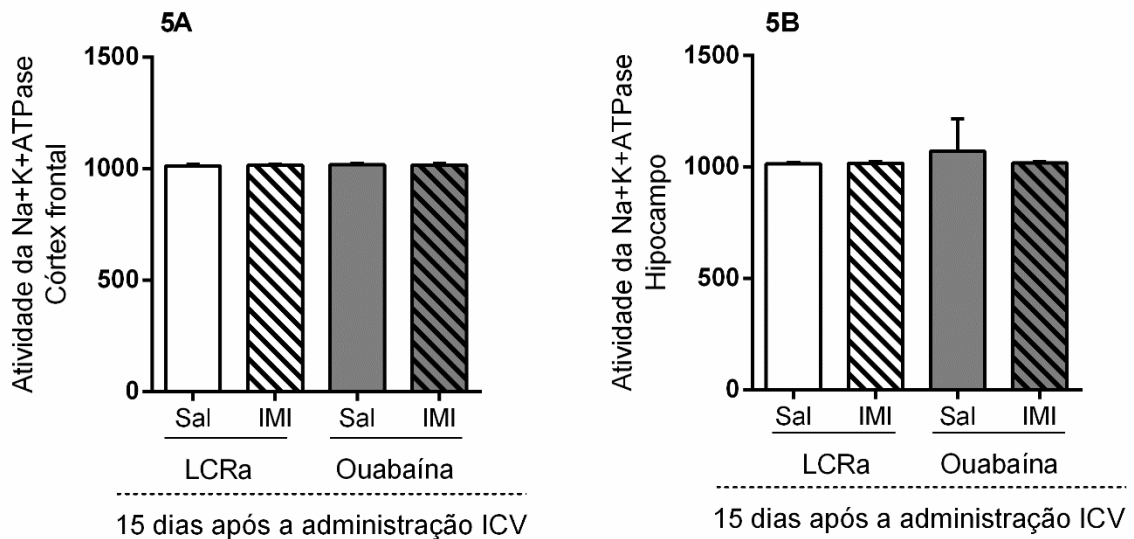


Figura 5: Efeitos da administração de ouabaína (OUA) per se ou associada ao tratamento com imipramina (IMI) sobre a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos 15 dias após a administração de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa). As barras representam média \pm erro padrão de acordo com o teste ANOVA de duas vias. Dados do ANOVA de duas vias para a administração de OUA [córtex frontal: $F(1,28)=1,6$, $p=0,217$; hipocampo: $F(1,28)=1,261$, $p=0,271$]; para o tratamento com IMI [córtex frontal: $F(1,28)=0,0$, $p=0,942$; hipocampo: $F(1,28)=0,936$, $p=0,342$] e para a interação entre OUA e IMI [córtex frontal: $F(1,28)=1,1$, $p=0,305$; hipocampo: $F(1,28)=0,144$, $p<0,294$].

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados do teste de campo aberto demonstram que a injeção ICV de OUA foi capaz de induzir comportamento do tipo maníaco nos animais, sete dias após a sua administração. O efeito do tipo maníaco da OUA em animais tem sido descrito há muito tempo (elMallakh et al., 1995), e o primeiro modelo animal de mania induzido por OUA contemplando suas três validades foi primeiramente descrito por El-Mallakh et al. (1983). Atualmente esse é um dos modelos farmacológicos mais bem estabelecidos para o estudo da neurobiologia do TB (Logan e McClun, 2016). Diversos estudos também demonstraram aumento na atividade locomotora, atividade exploratória, comportamento de risco e comportamento estereotípico sete dias após a administração de OUA, corroborando os resultados do presente estudo (Dal-Pont et al., 2019; Valvassori et al., 2017a; 2017b; Tonin et al., 2014).

Já no teste de nado forçado, os animais apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade e aumento no tempo de natação e escalada sete dias após a administração de OUA. O teste de nado forçado foi descrito por Porsolt et al. (1977) como uma ferramenta para avaliação de efeitos antidepressivos de determinadas substâncias. Atualmente, o teste também é utilizado para a avaliação de comportamento do tipo depressivo, onde o aumento do tempo de imobilidade é associado com um estado de desesperança e desmotivação, sintomas observados em pacientes com TB (Yankelevitch-Yahav et al., 2015; Commons et al., 2017). Entretanto, diversos fatores podem confundir os resultados desse teste, entre eles a hiperatividade locomotora (Bogdanova et al., 2013). A hiperlocomoção induzida por eventos estressores ou psicoestimulantes acabam por diminuir o tempo de imobilidade no teste de nado; entretanto, esses efeitos não estão relacionados com comportamentos do tipo depressivo ou efeitos antidepressivos, agindo como fatores de confusão (Strekalova et al., 2005). Uma vez que os animais apresentam aumento da atividade locomotora sete dias após a injeção de OUA, é esperado que o tempo de imobilidade no teste de nado forçado seja reduzido; entretanto, essa diminuição não está relacionada a um efeito antidepressivo da OUA. Em conjunto com os resultados do teste de campo aberto, e com os demais dados da literatura, é possível afirmar que o comportamento dos animais sete dias após a administração de OUA pode ser relacionado a um estado maníaco observado em pacientes bipolares na clínica.

Interessantemente, nove dias após a injeção de OUA não foi possível observar nenhuma alteração no teste de nado forçado e apenas uma diminuição no número de visitas ao centro do campo aberto, quando comparado com o grupo controle. Valvassori et al., (2019)

também demonstraram que a administração de OUA não causa alteração comportamental no teste de campo aberto e nado forçado nove dias após a injeção ICV, sugerindo que esse período de remissão de alterações comportamentais pode estar mimetizando a fase eutímica do TB. De fato, o conceito clínico de eutímia compreende tanto o período onde o paciente apresenta remissão total dos sintomas quanto o período intra-episódico, no qual o paciente não apresenta sintomas de humor o suficiente para ser classificado em um episódio de humor específico (Fava e Bech, 2016). Sendo assim, a ausência de alteração comportamental observada 9 dias após a injeção ICV pode não estar relacionada apenas com a atenuação dos efeitos da OUA, mas sim a um período de transição entre o estado do tipo maníaco para tipo depressivo (Valvassori et al., 2019).

De fato, o presente estudo foi capaz de reproduzir um estudo prévio, que demonstrou que uma única administração de OUA é capaz de induzir comportamentos do tipo maníaco 7 dias após a sua administração ICV, comportamentos do tipo eutímicos 9 dias após e comportamentos do tipo depressivos 14 dias após a administração dessa substância, reproduzindo todas as fases do TB em um mesmo animal (Valvassori et al., 2019). Em uma metanálise, Looney e El-Mallakh (1997) demonstraram diminuição da Na⁺K⁺-ATPase em eritrócitos de pacientes bipolares, tanto na fase maníaca quanto na fase depressiva, quando comparados com os pacientes que estavam em eutímia. Além disso, outro estudo avaliou vários aspectos de resposta à Na⁺K⁺-ATPase, como transcrição, tradução, atividade e concentração intracelular de íons, em células linfoblastóides de pacientes bipolares e de controles saudáveis. Neste estudo, os pesquisadores observaram que, ao contrário dos controles, as células derivadas de pacientes bipolares não alteram os parâmetros de resposta ao transporte de Na⁺ e, conseqüentemente, possuem uma alta concentração de Na⁺ no meio intracelular (Li e El-Mallakh, 2004). A partir desses estudos, podemos sugerir que alterações na enzima Na⁺K⁺-ATPase podem ser uma hipótese atrativa para explicar, pelo menos em parte, a fisiopatologia do TB.

Mas como pode ser explicado o fato de uma mesma substância induzir comportamentos opostos em um mesmo animal? Inicialmente, a administração de OUA, ao inibir a Na⁺K⁺-ATPase, faz com que a célula demore a voltar ao potencial de repouso, deixando o neurônio hiperexcitado (McCarren e Alger, 1987). Portanto, uma teoria atrativa para explicar os comportamentos do tipo maníacos induzidos pela OUA seria que essa diminuição da atividade da Na⁺K⁺-ATPase, que também é observada nos pacientes, possa estar aumentando a hiperexcitação neuronal, levando à presença dos sintomas do tipo maníaco nos animais. Entretanto, não existem muitos estudos que explicam mais detalhadamente o papel da inibição

da atividade da Na^+K^+ -ATPase na depressão bipolar ou sobre os comportamentos do tipo depressivos induzidos pela OUA. O que tem sido sugerido é que a inibição duradoura da atividade desta enzima, que aumenta a excitabilidade celular e diminui o controle da repolarização neuronal, pode diminuir a velocidade de recuperação neuronal e, conseqüentemente, diminuir também a eficiência sináptica dos neurônios, levando aos episódios depressivos do TB (Lichtstein et al., 2018).

Outro ponto importante a ser ressaltado é que um estudo prévio demonstrou que a administração de lítio e valproato, fármacos clássicos utilizados para o tratamento do TB, reverteram os comportamentos do tipo maníaco e a maioria dos comportamentos do tipo depressivos induzidos pela OUA (Valvassori et al., 2019). De fato, é bem descrito na literatura que o lítio e o valproato possuem uma boa ação antimaníaca; entretanto, esses estabilizadores do humor apresentam uma modesta ação antidepressiva, o que leva o tratamento desta condição médica à polifarmácia. Entretanto, o manejo da depressão bipolar é extremamente complexo pelo fato de que a administração de antidepressivos pode levar a uma virada maníaca, agravando o quadro do transtorno (Ghaemi, 2008). Por isso, modelos animais que mimetizem o quadro de virada maníaca são extremamente importantes para que se possa testar substâncias antidepressivas que não induzam virada maníaca no TB. No presente estudo pode-se observar que 14 dias após a administração de OUA não alterou a atividade locomotora e exploratória dos animais; entretanto, a administração ICV de ouabaína somada ao tratamento subcrônico com imipramina induziu o aumento desses parâmetros comportamentais, mimetizando um quadro de virada maníaca. É importante ressaltar que a imipramina *per se* também não alterou a atividade locomotora dos animais e somente quando somada a OUA induziu comportamentos do tipo-maníacos nos animais.

Na tentativa de tentar explicar o mecanismo de ação de como a imipramina induziu comportamentos do tipo virada maníaca nos animais previamente submetidos a administração ICV de OUA, foi avaliada a atividade da Na^+K^+ -ATPase 14 dias após a administração ICV de OUA. A literatura mostra que a imipramina reduz em 10% a atividade dessa enzima em cérebro, quando avaliado *in vitro* (Zanatta et al., 2001). Já que a OUA é um inibidor da Na^+K^+ -ATPase, a hipótese foi de que a OUA poderia deixar a atividade desta enzima vulnerável e que a imipramina poderia inibir ainda mais essa enzima em animais submetidos previamente à essa substância. Entretanto, o presente estudo mostrou que nem a OUA sozinha, nem associada à imipramina apresentaram alterações na atividade dessa enzima. De fato, um estudo prévio demonstrou que OUA diminui a atividade da Na^+K^+ -ATPase e que esse efeito permanece por 7 dias após a administração dessa substância. Entretanto, 9 e 14 dias após a administração de

OUA a atividade da Na^+K^+ -ATPase volta aos níveis basais (Valvassori et al., 2019). Portanto, o comportamento do tipo virada maníaca apresentada pelos animais do grupo ouabaína+IMI não pode ser explicada por alterações da atividade da Na^+K^+ -ATPase.

A imipramina é um antidepressivo do tipo tricíclico (Demontis et al., 2017), o qual há muito tempo já se tem descrito como um indutor de virada maníaca (Kuhn, 1958). Os mecanismos de ação conhecidos da imipramina incluem a inibição da recaptação de serotonina e de noradrenalina, aumentando a concentração desses dois neurotransmissores na fenda sináptica. Além disso, esse antidepressivo aumenta a função dopaminérgica, através da hipossensibilização dos autorreceptores dopaminérgicos, os quais tem a função de aumentar ou reduzir a quantidade de dopamina liberada para o espaço extracelular, dependendo da quantidade deste neurotransmissor na fenda sináptica (Serra et al., 1979). É bem descrito na literatura a relação entre sintomas maníacos e a estimulação do sistema dopaminérgico. Um exemplo clássico dessa situação é que quando administrada anfetamina (AMPH), uma substância agonista do sistema dopaminérgico, são desencadeados sintomas maníacos tanto em pacientes bipolares quanto em voluntários saudáveis; sendo que as alterações comportamentais nos bipolares foram mais intensas (Anand et al., 2000). De fato, estudos pré-clínicos utilizam anfetaminas para mimetizar sintomas maníacos em roedores, como hiperatividade, comportamento de risco, aumento da atividade sexual e diminuição do sono (Resende et al., 2013; Valvassori et al., 2015). Estudos prévios também demonstram que a OUA aumenta a liberação de dopamina no córtex frontal de ratos Sprague-Dawley (Sui et al., 2013). Portanto, sugere-se que alterações no sistema dopaminérgico induzidas tanto pela imipramina quanto pela ouabaína possa ser uma possível explicação para o comportamento do tipo virada maníaca observado no presente estudo.

É importante destacar que tanto estudos clínicos quanto pré-clínicos têm associado as alterações da Na^+K^+ -ATPase a outros eventos bioquímicos e moleculares observados do TB, como aumento de estresse oxidativo e diminuição de fatores neurotróficos (Jornada et al., 2010; 2011). A administração de OUA em ratos leva a um aumento de dano oxidativo à lipídios, à proteína e alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, que são duradouras e podem ser observadas 7, 9 e 14 dias após a administração dessa substância (Valvassori et al., 2019). Sabe-se que o estresse oxidativo pode levar a alterações na célula neuronal importantes, como danos à proteínas e lipídeos de membrana, incluindo canais, receptores, autorreceptores, os quais são importantes para a sinalização neuronal (Tarafdar e Pula G, 2018).

Um estudo prévio também demonstrou que a administração ICV de OUA em ratos diminui os níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (sigla do inglês BDNF) e de seu

receptor, o TrKB, sendo que essa diminuição acompanha comportamentos tanto do tipo maníacos (7 dias após a administração ICV), quanto do tipo depressivos (14 dias após a administração ICV). Os fatores neurotróficos correspondem a um grupo de proteínas responsáveis pela regulação dos processos de sobrevivência, crescimento neuronal, formação sináptica e plasticidade celular do sistema nervoso central e periférico (Gomez-Palacio-Schjetnan e Escobar, 2013). Diversos estudos indicam que alterações em vias de sinalização do BDNF e o aumento de estresse oxidativo podem ser os fatores chaves ligados a morte celular, vista no cérebro de pacientes bipolares e, conseqüentemente, uma possível explicação para a fisiopatologia do TB (Carter, 2007; Kapczinski et al., 2008). Portanto, o estresse oxidativo e a diminuição de BDNF pode deixar o cérebro vulnerável, danificando estruturas cerebrais importantes, levando a alterações do humor e resposta farmacológica inadequada, observadas tanto no modelo de OUA, quanto em pacientes bipolares.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, a IMI, apesar de reverter comportamento do tipo depressivo induzidos por OUA, levou à comportamentos do tipo maníaco nos animais previamente submetidos a administração ICV de OUA. Sugere-se que a administração de IMI em ratos previamente submetidos a OUA é um modelo animal adequado para estudar os mecanismos envolvidos na virada-maníaca. Além disso, o modelo animal de TB induzido por OUA pode ser considerado um modelo relevante para a avaliar possíveis fármacos para o tratamento da depressão bipolar.

REFERÊNCIAS

- Alenina N, Klempin F. The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res.* 2015; 277:49-57.
- Allain N, Leven C, Falissard B, Allain JS, Batail JM, Polard E, Montastruc F, Drapier D, Naudet F. Manic switches induced by antidepressants: an umbrella review comparing randomized controlled trials and observational studies. *Acta Psychiatr Scand.* 2017; 135(2):106-116.
- Allen SA, Rednour S, Shepard S, Pond BB. A simple and sensitive high-performance liquid chromatography-electrochemical detection assay for the quantitative determination of monoamines and respective metabolites in six discrete brain regions of mice. *Biomed Chromatogr.* 2017; 31(11):e3998
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5^a ed. Washinton, DC: American Psychiatric Publishing; 2013.
- Anand A, Verhoeff P, Seneca N, Zoghbi SS, Seibyl JP, Charney DS, Innis RB. Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *Am J Psychiatry.* 2000; 157(7):1108-14.
- Anderson G, Maes M. Bipolar disorder: role of immune-inflammatory cytokines, oxidative and nitrosative stress and tryptophan catabolites. *Curr Psychiatry Rep.* 2015; 17(2):8.
- Andrade R, Haj-Dahmane S. Serotonin neuron diversity in the dorsal raphe. *ACS Chem Neurosci.* 2013; 4(1):22-5.
- Angst J. Switch from depression to mania: a record study over decades between 1920 and 1982. *Psychopathology.* 1985; 18:140–154
- Antosik-Wójcińska AZ, Stefanowski B, Świącicki Ł. Efficacy and safety of antidepressant's use in the treatment of depressive episodes in bipolar disorder - review of research. *Psychiatr Pol.* 2015;49(6):1223-39.
- Azarin JM. Bipolar disorder: inter-episode symptoms. *Encephale.* 2012; 4:147-50.
- Baldessarini RJ, Leahy L, Arcona S, Gause D, Zhang W, Hennen J. Patterns of psychotropic drug prescription for US patients with diagnoses of bipolar disorders. *Psychiatr Serv.* 2007; 58:85–91
- Ball JR, Kiloh LG. A controlled trial of imipramine in treatment of depressive states. *BMJ.* 1959; 2:1052–1055
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011; 63(1):182-217.
- Beneyto M, Kristiansen LV, Oni-Orisan A, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH. Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32(9):1888-902.
- Beneyto M, Meador-Woodruff JH. Lamina-specific abnormalities of AMPA receptor trafficking and signaling molecule transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Synapse.* 2006; 60(8):585-98.

- Beneyto M, Meador-Woodruff JH. Lamina-specific abnormalities of NMDA receptor-associated postsynaptic protein transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(9):2175-86.
- Boerlin HL, Gitlin MJ, Zoellner LA, Hammen CL. Bipolar depression and antidepressant-induced mania: a naturalistic study. *J Clin Psychiatry*. 1998; 59:374–379.
- Bogdanova OV, Kanekar S, D'Ancid KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*. 2013; 118: 227–239.
- Boku S, Nakagawa S, Toda H, Hishimoto A. Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018; 72(1):3-12.
- Borodovitsyna O, Flamini M, Chandler D. Noradrenergic Modulation of Cognition in Health and Disease. *Neural Plast*. 2017; 2017:6031478.
- Bottlender R, Rudolf D, Strauss A, Möller HJ. Mood-stabilisers reduce the risk of developing antidepressant-induced manic states in acute treatment of bipolar I depressed patients. *J Affect Disord* 2001; 63:79–83
- Brietzke E, Rosa AR, Pedrini M, Noto MN, Kapczinski F, Scott J. Challenges and developments in research of the early stages of bipolar disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2016; 38(4):329-337.
- Bunney WE Jr, Murphy DL, Goodwin FK, Borge GF. The switch process from depression to mania: relationship to drugs which alter brain amines. *Lancet*. 1970; 1(7655):1022–1027.
- Carter CJ. Multiple genes and factors associated with bipolar disorder converge on growth factor and stress activated kinase pathways controlling translation initiation: implications for oligodendrocyte viability. *Neurochem Int*. 2007;50(3):461-90.
- Choo M, Hwang JA, Jeon SW, Oh SY, Yoon HK, Lee HJ, Kim YK. Association Study between Norepinephrine Transporter Gene Polymorphism and Schizophrenia in a Korean Population. *Psychiatry Investig*. 2015; 12(4):551-8.
- Chou YH, Hsieh WC, Chen LC, Lirng JF, Wang SJ. Association between the serotonin transporter and cytokines: Implications for the pathophysiology of bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2016a;191:29-35.
- Chou YH, Lirng JF, Hsieh WC, Chiu YC, Tu YA, Wang SJ. Neither cortisol nor brain-derived neurotrophic factor is associated with serotonin transporter in bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016b; 26(2):280-287.
- Coccaro EF, Fanning JR, Phan KL, Lee R. Serotonin and impulsive aggression. *CNS Spectr*. 2015; 20(3):295-302.
- Coleman JA, Green EM, Gouaux E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature*. 2016; 532(7599):334-339.
- Commons KG, Cholani AB, Babb JA, Ehlinger DG. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci*. 2017 May 17;8(5):955-960.
- Coppen A, Shaw DM, Malleon A, Costain R. Mineral metabolism in mania. *Br Med J*. 1966; 1(5479):71-5.

- Coyle JT, Duman RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron*. 2003; 38(2):157-60.
- Dal-Pont GC, Resende WR, Varela RB, Menegas S, Trajano KS, Peterle BR, Quevedo J, Valvassori SS. Inhibition of GSK-3 β on Behavioral Changes and Oxidative Stress in an Animal Model of Mania. *Mol Neurobiol*. 2019; 56(4):2379-2393.
- de Bartolomeis A, Buonaguro EF, Iasevoli F, Tomasetti C. The emerging role of dopamine-glutamate interaction and of the postsynaptic density in bipolar disorder pathophysiology: Implications for treatment. *J Psychopharmacol*. 2014; 28(6):505-26.
- Demontis F, Serra F, Serra G. Antidepressant-induced Dopamine Receptor Dysregulation: A Valid Animal Model of Manic-Depressive Illness. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(3):417-423.
- Devilbiss DM, Page ME, Waterhouse BD. Locus ceruleus regulates sensory encoding by neurons and networks in waking animals. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 26(39):9860–9872.
- Devon RS, Anderson S, Teague PW, Muir WJ, Murray V, Pelosi AJ, Blackwood DH, Porteous DJ. The genomic organisation of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 gene, and its association with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2001; 6(3):311-4.
- Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, Jaffe H. Preparation of postsynaptic density fraction from hippocampal slices and proteomic analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 339(2):687-94.
- Du J, Feng L, Zaitsev E, Je HS, Liu XW, Lu B. Regulation of TrkB receptor tyrosine kinase and its internalization by neuronal activity and Ca²⁺ influx. *J Cell Biol*. 2003;163(2):385-95.
- Du J, Quiroz JA, Gray NA, Szabo ST, Zarate CA Jr, Manji HK. Regulation of cellular plasticity and resilience by mood stabilizers: the role of AMPA receptor trafficking. *Dialogues Clin Neurosci*. 2004; 6(2):143-55.
- Du J. The messengers from peripheral nervous system to central nervous system: involvement of neurotrophins and cytokines in the mechanisms of acupuncture. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2008; 33(1):37-40.
- Dubovsky SL, Thomas M, Hijazi A, Murphy J. Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1994; 243(5):229-34.
- Dutta A, McKie S, Deakin JFW. Ketamine and other potential glutamate antidepressants. *Psychiatry Res*. 2015; 225(1-2):1-13.
- Efimova EV, Gainetdinov RR, Budygin EA, Sotnikova TD. Dopamine transporter mutant animals: a translational perspective. *J Neurogenet*. 2016; 30(1):5-15.
- Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 1990;1(6):469-490.
- El-Maghrabi EA, Eckenhoff RG. Inhibition of dopamine transport in rat brain synaptosomes by volatile anesthetics. *Anesthesiology*. 1993; 78(4):750-6.
- El-Mallakh RS, Harrison LT, Li R, Changaris DG, Levy RS. An animal model for mania: preliminary results. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1995; 19:955–962.
- Fava GA, Bech P. The concept of euthymia. *Psychother Psychosom*. 2016; 85:1–5.

Fernandes FB, Rocca CC, Gigante AD, Dottori-Silva PR, Gerchmann L, Rossini D, Nery FG. The association between social skills deficits and family history of mood disorder in bipolar I disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2018; 40(3):244-248.

Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(5):526-32.

Genestine M, Lin L, Durens M, Yan Y, Jiang Y, Prem S, Bailoor K, Kelly B, Sonsalla PK, Matteson PG, Silverman J, Crawley JN, Millonig JH, DiCicco-Bloom E. Engrailed-2 (En2) deletion produces multiple neurodevelopmental defects in monoamine systems, forebrain structures and neurogenesis and behavior. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(20):5805-27.

Ghaemi SN. Treatment of rapid-cycling bipolar disorder: are antidepressants mood destabilizers? *Am J Psychiatry*. 2008; 165(3):300-2.

Gigante AD, Barenboim IY, Dias RDS, Toniolo RA, Mendonça T, Miranda-Scippa Â, Lafer B. Psychiatric and clinical correlates of rapid cycling bipolar disorder: a cross-sectional study. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2016; 38(4), 270-274.

Golubeva AV, Moloney RD, O'Connor RM, Dinan TG, Cryan JF1. Metabotropic Glutamate Receptors in Central Nervous System Diseases. *Curr Drug Targets*. 2016; 17(5):538-616.

Gómez-Palacio-Schjetnan A1, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013;15:117-36.

Gorwood P, Richard-Devantoy S, Sentissi O, Le Strat Y, Olié JP. The number of past manic episodes is the best predictor of antidepressant-emergent manic switch in a cohort of bipolar depressed patients *Psychiatry Res*. 2016; 240:288-294.

Gupta A, Sharma PK, Garg VK, Singh AK, Mondal SC. Role of serotonin in seasonal affective disorder. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17(1):49-55.

Hagena H, Hansen N, Manahan-Vaughan D. Betaadrenergic control of hippocampal function: subserving the choreography of synaptic information storage and memory. *Cerebral Cortex*. 2016; 26(4) 1349–1364.

Herman L, Houglund T, El-Mallakh RS. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats *Neurosci Biobehav Rev*. 2007 ;31(6):874-81.

Janitzky K, D'Hanis W, Kröber A, Schwegler H. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. *Brain Res*. 2015; 1599:1-8.

Jian J, Li C, Xu J, Qiao D, Mi G, Chen X, Tang M. Associations of serotonin receptor gene HTR3A, HTR3B, and HTR3A haplotypes with bipolar disorder in Chinese patients. *Genet Mol Res*. 2016; 15(3).

Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res*. 2010; 44(8):506-10.

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

- Joyce PR, Fergusson DM, Woollard G, Abbott RM, Horwood LJ, Upton J. Urinary catecholamines and plasma hormones predict mood state in rapid cycling bipolar affective disorder. *J Affect Disord.* 1995; 33(4):233-43.
- Juckel G, Hegerl U, Mavrogiorgou P, Gallinat J, Mager T, Tigges P, Dresel S, Schröter A, Stotz G, Meller I, Greil W, Möller HJ. Clinical and biological findings in a case with 48-hour bipolar ultrarapid cycling before and during valproate treatment. *J Clin Psychiatry* 2000;61(8): 585–593.
- Li R, El-Mallakh RS. Differential response of bipolar and normal control lymphoblastoid cell sodium pump to ethacrynic acid. *J Affect Disord.* 2004;80(1):11-7.
- Lichtstein D, Ilani A, Rosen H, Horesh N, Singh SV, Buzaglo N, Hodes A. Na⁺, K⁺-ATPase Signaling and Bipolar Disorder. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
- Looney SW1, el-Mallakh RS. Meta-analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. *Depress Anxiety.* 1997;5(2):53-65.
- Kaalund SS, Newburn EN, Ye T, Tao R, Li C, Deep-Soboslay A, Herman MM, Hyde TM, Weinberger DR, Lipska BK, Kleinman JE. Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain. *Mol Psychiatry.* 2014; 19(12):1258-66.
- Kapczinski F, Quevedo J. *Transtorno bipolar: teoria e clínica.* 2^aed. Porto Alegre: Artmed; 2015.
- Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, Kauer-Sant'anna M, Grassi-Oliveira R, Post RM. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(4):675-92.
- Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Braz J Psychiatry.* 2008;30(3):243-5.
- Kapczinski NS, Mwangi B, Cassidy RM, Librenza-Garcia D, Bermudez MB, Kauer-Sant'anna M, Kapczinski F, Passos IC. Neuroprogression and illness trajectories in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother.* 2017;17(3):277-285.
- Kuhn R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry.* 1958; 115(5):459-64.
- Kraus C, Castrén E, Kasper S, Lanzenberger R. Serotonin and neuroplasticity - Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017; 77:317-326.
- Kraus C, Rabl U, Vanicek T, Carlberg L, Popovic A, Spies M, Bartova L, Gryglewski G, Papageorgiou K, Lanzenberger R, Willeit M, Winkler D, Rybakowski JK, Kasper S. Administration of ketamine for unipolar and bipolar depression. *Int J Psychiatry Clin Pract.* 2017; 21(1):2-12.
- Kurita M. Noradrenaline plays a critical role in the switch to a manic episode and treatment of a depressive episode. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016 Sep 20;12:2373-2380. eCollection 2016.
- Li R, El-Mallakh RS. Differential response of bipolar and normal control lymphoblastoid cell sodium pump to ethacrynic acid. *J Affect Disord.* 2004; 80(1):11-7.

- Lichtstein D, Ilani A, Rosen H, Horesh N, Singh SV, Buzaglo N, Hodes A. Na⁺, K⁺-ATPase Signaling and Bipolar Disorder. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(8):E2314.
- Liu EH, Qi LW, Cheng XL, Peng YB, Li P. Simultaneous determination of twelve bioactive constituents in Buyang Huanwu decoction by HPLC-DAD-ELSD and HPLC-TOF/MS. *Biomed Chromatogr*. 2010; 24(2):125-31.
- Logan RW, McClung CA. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience*. 2016; 321:163-188.
- Lohse MJ. The ins and outs of adrenergic signaling. *J Mol Med (Berl)*. 2015; 93(9):955-62.
- Looney SW, el-Mallakh RS. Meta-analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. *Depress Anxiety*. 1997; 5(2):53-65.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-75.
- Mahmood T, Silverstone T. Serotonin and bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2001; 66(1):1-11.
- Maj M, Pirozzi R, Magliano L, Bartoli L. The prognostic significance of “switching” in patients with bipolar disorder: a 10-year prospective follow-up study. *Am J Psychiatry*. 2002; 159:1711–1717.
- Martí SB, Cichon S, Propping P, Nöthen M. Metabotropic glutamate receptor 3 (GRM3) gene variation is not associated with schizophrenia or bipolar affective disorder in the German population. *Am J Med Genet*. 2002; 114(1):46-50.
- McCarren M, Alger BE. Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice: role of a Ca²⁺-dependent conductance. *J Neurophysiol*. 1987; 57(2):496-509.
- McCormick U, Murray B, McNew B. Diagnosis and treatment of patients with bipolar disorder: A review for advanced practice nurses. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2015; 27(9):530-42.
- McCullumsmith RE, Kristiansen LV, Beneyto M, Scarr E, Dean B, Meador-Woodruff JH. Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res*. 2007; 1127(1):108-18.
- McIntyre RS, Cha DS, Kim RD, Mansur RB. A review of FDA-approved treatment options in bipolar depression. *CNS Spectr*. 2013; 18(1):4-20.
- McMillan PJ, White SS, Franklin A, Greenup JL, Leverenz JB, Raskind MA, Szot P. Differential response of the central noradrenergic nervous system to the loss of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2011; 1373:240-52.
- Monti JM, Jantos H. The role of serotonin 5-HT₇ receptor in regulating sleep and wakefulness. *Rev Neurosci*. 2014; 25(3):429-37.
- Moreno MPV, Bücken J, Bürke KP, Czepielewski L, Santos BT, Fijtman A, Passos IC, Kunz M, Bonnín CD, Vieta E, Kapczinski F, Rosa AR, Kauer-Sant'Anna M. Cognitive performance and psychosocial functioning in patients with bipolar disorder, unaffected siblings, and healthy controls. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2016; 38(4):275-280.
- Navarra RL, Clark BD, Gargiulo AT, Waterhouse BD. Methylphenidate enhances early stage sensory processing and rodent performance of a visual signal detection task. *Neuropsychopharmacology*. 2017; 42(6):1326–1337.

- Nivoli AM, Colom F, Murru A, Pacchiarotti I, Castro-Loli P, González-Pinto A, Fountoulakis KN, Vieta E. New treatment guidelines for acute bipolar depression: a systematic review. *J Affect Disord.* 2011; 129:14–26.
- Palacios JM. Serotonin receptors in brain revisited. *Brain Res.* 2016; 1645:46-9.
- Pereira LL, Dias ACG, Caeran J, Collares LA, Penteadó RV. Transtorno bipolar: reflexões sobre diagnóstico e tratamento. *Revista Perspectiva.* 2010; 34(128):151-166.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977; 220:327–336.
- Post RM, Stoddard FJ, Gillin JC, Buchsbaum MS, Runkle DC, Black KE, Bunney WE Jr. Alterations in motor activity, sleep, and biochemistry in a cycling manic-depressive patient. *Arch Gen Psychiatry.* 1977; 34(4):470-7.
- Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafai RA, Khaku A, Mondello S, Gold MS, Kobeissy FH. An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience.* 2013; 240:204-18.
- Reininghaus EZ, McIntyre RS, Reininghaus B, Geisler S, Bengesser SA, Lackner N, Hecht K, Birner A, Kattinig F, Unterweger R, Kapfhammer HP, Zelzer S, Fuchs D, Mangge H. Tryptophan breakdown is increased in euthymic overweight individuals with bipolar disorder: a preliminary report. *Bipolar Disord.* 2014; 16(4):432-40.
- Resende WR, Valvassori SS, Réus GZ, Varela RB, Arent CO, Ribeiro KF, Bavaresco DV, Andersen ML, Zugno AI, Quevedo J. Effects of sodium butyrate in animal models of mania and depression: implications as a new mood stabilizer. *Behav Pharmacol.* 2013;24(7):569-79.
- Rowland TA, Marwaha S. Epidemiology and risk factors for bipolar disorder. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2018;8(9):251-269.
- Salvadore G, Quiroz JA, Machado-Vieira R, Henter ID, Manji HK, Zarate CA Jr. The neurobiology of the switch process in bipolar disorder: a review. *J Clin Psychiatry.* 2010; 71(11):1488-501.
- Sara SJ, Bouret S. Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron.* 2012; 76(1):130–141.
- Scheefhals N, MacGillavry. Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Mol Cell Neurosci.* 2018; 91:82-94.
- Schmeichel BE, Berridge CW. Neurocircuitry underlying the preferential sensitivity of prefrontal catecholamines to low-dose psychostimulants. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(6):1078-84.
- Seki K, Yoshida S, Jaiswal MK. Molecular mechanism of noradrenaline during the stress-induced major depressive disorder. *Neural Regen Res.* 2018; 13(7):1159-1169.
- Seyedabadi M, Fakhfour G, Ramezani V, Mehr SE, Rahimian R. The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling. *Exp Brain Res.* 2014; 232(3):723-38.
- Serra, G.; Argiolas, A.; Klimek, V.; Fadda, F.; Gessa, G.L. Chronic treatment with antidepressants prevents the inhibitory effect of small doses of apomorphine on dopamine synthesis and motor activity. *Life Sci.*, 1979; 25(5), 415-423.
- Silverstone T. Mood, food and 5-HT. *Int Clin Psychopharmacol.* 1993; 8(2):91-4.

- Songtachalert T, Roomruangwong C, Carvalho AF, Bourin M, Maes M. Anxiety Disorders: Sex Differences in Serotonin and Tryptophan Metabolism. *Curr Top Med Chem*. 2018; 18(19):1704-1715.
- Sourial-Bassillious N, Rydelius PA, Aperia A, Aizman O. Glutamate-mediated calcium signaling: a potential target for lithium action. *Neuroscience*. 2009; 161(4):1126-34.
- Strekalova T, Spanagel R, Dolgov O, Bartsch D. Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. *Behav Pharmacol*. 2005; 16(3):171-80.
- Sui L, Song XJ, Ren J, Ju LH, Wang Y. Intracerebroventricular administration of ouabain alters synaptic plasticity and dopamine release in rat medial prefrontal cortex. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(8):1191-9.
- Szeitz A, Bandiera SM. Analysis and measurement of serotonin. *Biomed Chromatogr*. 2018; 32(1).
- Tarafdar A, Pula G. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12). pii: E3824.
- Tondo L, Vázquez G, Baldessarini RJ. Mania associated with antidepressant treatment: comprehensive meta-analytic review. *Acta Psychiatr Scand*. 2010; 121:404–414.
- Tonin PT, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Varela RB, Teixeira AL, Quevedo J. Effects of ouabain on cytokine/chemokine levels in an animal model of mania. *J Neuroimmunol*. 2014; 276(1-2):236-9.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 24(1):125-32.
- Valvassori SS, Tonin PT, Varela RB, Carvalho AF, Mariot E, Amboni RT, Bianchini G, Andersen ML, Quevedo J. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disord*. 2015a; 17(5):507-17.
- Valvassori SS, Resende WR, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on oxidative stress-induced cell death signaling pathways in the brains of rats subjected to the ouabain-induced animal model of mania: Mood stabilizers exert protective effects against ouabain-induced activation of the cell death pathway. *J Psychiatr Res*. 2015b; 65:63-70.
- 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;1 17:447-459.
- 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; 20(11):877-885.
- 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*. 2019a; 9(1):158.

- Valvassori SS, Resende WR, Varela RB, Arent CO, Gava FF, Peterle BR, Dal-Pont GC, Carvalho AF, Andersen ML, Quevedo J. The Effects of Histone Deacetylase Inhibition on the Levels of Cerebral Cytokines in an Animal Model of Mania Induced by Dextroamphetamine. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(2):1430-1439.
- van Enkhuizen J, Janowsky DS, Olivier B, Minassian A, Perry W, Young JW, Geyer MA. The catecholaminergic-cholinergic balance hypothesis of bipolar disorder revisited. *Eur J Pharmacol*. 2015; 753:114-26.
- Vazey EM, Aston-Jones G. Designer receptor manipulations reveal a role of the locus coeruleus noradrenergic system in isoflurane general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(10):3859–3864.
- Viktorin A, Lichtenstein P, Thase ME, Larsson H, Lundholm C, Magnusson PK, Landén M. The risk of switch to mania in patients with bipolar disorder during treatment with an antidepressant alone and in combination with a mood stabilizer. *Am J Psychiatry*. 2014; 171(10):1067-73.
- Villa EU, Gutiérrez Briceño P, Palacio JD, García J. Psychopathological profiles of offspring of subjects with bipolar disorder. *Revista colombiana de psiquiatria*. 2012; 41(1):15-25.
- Visser HM, Van Der Mast RC. Bipolar disorder, antidepressants, and induction of hypomania or mania: a systematic review. *World J Biol Psychiatry*. 2005; 6:231–241.
- Willard SS, Koochekpour S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci*. 2013; 9(9):948-59.
- Winklewski PJ, Radkowski M, Wszedybyl-Winklewska M, Demkow U. Stress Response, Brain Noradrenergic System and Cognition. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 980:67-74.
- 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; 18(12):E2679.
- Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*. 2015 Mar 2;(97). doi: 10.3791/52587.
- Young LT, Joffe RT, Robb JC, MacQueen GM, Marriott M, Patelis-Siotis I. Double-blind comparison of addition of a second mood stabilizer versus an antidepressant to an initial mood stabilizer for treatment of patients with bipolar depression. *Am J Psychiatry*. 2000; 157:124–126.
- Zanatta LM1, Nascimento FC, Barros SV, Silva GR, Zugno AI, Netto CA, Wyse AT. In vivo and in vitro effect of imipramine and fluoxetine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membranes from the cerebral cortex of rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(10):1265-9.
- Zarate CA Jr, Brutsche NE, Ibrahim L, Franco-Chaves J, Diazgranados N, Cravchik A, Selter J, Marquardt CA, Liberty V, Luckenbaugh DA. Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: a randomized controlled add-on trial. *Biol Psychiatry*. 2012; 71(11):939-46.
- Zhao Z, Zhang HT, Bootzin E, Millan MJ, O'donnell JM. Association of changes in norepinephrine and serotonin transporter expression with the long-term behavioral effects of antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34(6):1467–1481.
- Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain *J Neural Transm (Vienna)*. 2014; 121(8):799-817.

ANEXOS

ANEXO I



CERTIFICADO


Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 10/09/2019.

Titulo do projeto	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IMPRAMINA EM RATOS SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE OUABAINA: IMPLICAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE VIRADA MANIACA.
Project title	EVALUATION OF IMPRAMINE EFFECTS IN RATS SUBMITTED TO THE OUABAIN ADMINISTRATION: IMPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF AN ANIMAL MODEL OF MANIC SWITCH
Número do protocolo Protocol number	101/2019
Pesquisador principal Principal Investigator	SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Pesquisadores Researchers	Gustavo Colombo Dal Pont, Samira Menegas Pereira, José Cararo da Silva, Carlos Augusto Padovan Marino, Jhoanne Merlyn Luiz, Fernanda Frederico Gava, Jefé Peper do Nascimento, Jorge Machado de Aguiar Geraldo, Taise de Souza Possamai Della, Amanda Hilsendeger Pereira de Oliveira, Letícia Hobold Kammer, Thiani Daminelli de Souza, Maria Eduarda Magagnin Pessetti, Alice Ferreira Inácio.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/09/2019 a 11/09/2020
Espécie/Inhagem/raça	Rato Heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250-300 g
Número de animais / Gênero	60 / masculino e 60 / feminino = 120
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that 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 by e-mail ceua@unesc.net.


Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador-Adjunto do CEUA

Criciúma, 10 de setembro de 2019.