

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

**CAMILA ORLANDI ARENT**

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE  
ESTRATÉGIAS ANTIOXIDANTES PARA OS TRANSTORNOS  
DO HUMOR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Luciano de Quevedo.

Coorientadoras: Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup>. Gislaine Zilli Réus e Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup>. Samira da Silva Valvassori

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A681e Arent, Camila Orlandi.

Estudo pré-clínico do potencial terapêutico de estratégias antioxidantes para os transtornos do humor / Camila Orlandi Arent ; orientador : João Luciano de Quevedo ; coorientadoras: Gislaine Zilli Réus, Samira da Silva Valvassori. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

85 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2014.

1. Transtorno depressivo maior. 2. Transtorno bipolar. 3. Psicose maníaco-depressiva. 4. Estresse oxidativo. 5. N-acetilcisteína. 6. Deferoxamina. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1

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



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a **arguição** da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Camila Orlandi Arent** sob o título **“Estudo pré-clínico do potencial terapêutico de estratégias antioxidantes para os transtornos do humor”** para obtenção do grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 19 de dezembro de 2014.

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI  
Membro Relator - UNESC

Profa. Dra. ALEXANDRA ZUGNO  
Membro Interno - UNESC

Profa. Dra. MANUELLA PINTO KASTER  
Membro Externo - UFSC

Profa. Dra. JUCÉLIA JEREMIAS FORTUNATO  
Membro Externo - UNISUL

Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza  
(Representando o Orientador  
João Luciano de Quevedo)

Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza  
Coordenador do PPGCS



## **FOLHA INFORMATIVA**

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências, da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



*Aos meus pais **Neusa e Volnei**,  
por delegarem a mim sua maior  
herança: “a busca incessante  
pelo saber”.*

*Ao meu esposo **Saulo**,  
companheiro em todos os  
momentos. Obrigada pelo  
cuidado, gestos e cumplicidade.*



## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais Neusa e Volnei, pelo amor sagrado a mim durante toda a vida.*

*Ao Saulo, meu esposo, companheiro e amigo que suportou amorosamente minha presença ausente e minhas angústias durante a elaboração desta tese.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. João Quevedo, por me aceitar como orientanda e oportunizar importantes aprendizados.*

*Às minhas co-orientadoras Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus e Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori pelo aprendizado, parceria e a cima de tudo amizade.*

*À Prof. Dra. Josiane Budni pelos ensinamentos, conselhos e amizade.*

*Aos colegas de doutorado e amigos Cenita, Roger, Tamara, Paula e Wilson que sempre estiveram ao meu lado, apoiando, contribuindo e tornando as jornadas de trabalho sempre agradáveis.*

*Aos alunos de iniciação científica Edemilson, Guilherme, Jéssica e Rafaela, pela árdua tarefa de executar este projeto com excelência. Partilho com vocês também estes resultados.*

*Aos meus grandes amigos Cristiane, Danon, Giane, Maykon, Stefânia e Samuel, que estão sempre presentes em minha vida. Obrigada pelo apoio, incentivo e amizade.*

*Aos demais colegas do Laboratório de Neurociências que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.*

*Por fim, meu agradecimento à CAPES pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho, à UNESC e aos professores do PPGCS pelos conhecimentos, auxílio e incentivo recebidos.*



*"Os homens devem saber que do cérebro, e só do cérebro, derivam prazer, alegria, riso e divertimento, assim como tristeza, pena, dor e medo."*

Hipocrates



## RESUMO

Os transtornos do humor são considerados importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O transtorno depressivo maior (TDM) e o transtorno bipolar (TB) encontram-se entre os dois mais severos e prevalentes transtornos do humor. Além disso, uma grande parcela dos pacientes psiquiátricos acometidos com esses transtornos não respondem satisfatoriamente aos fármacos disponíveis. Estudos sugerem o envolvimento de diferentes mecanismos fisiopatológicos, entre eles encontra-se o estresse oxidativo. Portanto, este estudo avaliou os efeitos de agentes antioxidantes, N-acetilcisteína (NAC) e/ou deferoxamina (DFX), sobre os parâmetros de comportamento e estresse oxidativo no cérebro de roedores submetidos a um modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado (ECM) em ratos ou a um modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP) em camundongos. Os animais foram tratados por sete dias com solução salina (SAL), NAC, DFX ou NAC + DFX, sendo submetidos aos protocolos de ECM ou PSP. Após os testes de atividade locomotora e de consumo de alimento doce no protocolo de ECM ou de atividade locomotora no protocolo de PSP, amostras de tecido cerebral foram dissecadas dos animais de ambos os protocolos e utilizadas para avaliar os parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados comportamentais demonstraram que ECM induziu a anedonia nos ratos e a PSP induziu hiperatividade nos camundongos, comportamentos do tipo depressivo e do tipo maníaco, respectivamente. Além disso, os protocolos de ECM e PSP aumentaram a peroxidação lipídica e o dano oxidativo às proteínas, bem como alterações nas enzimas antioxidantes em tecido cerebral de roedores. Em conjunto, estes resultados sugerem que o tratamento associado de NAC e DFX parece ser efetivo no tratamento de sintomas comportamentais do tipo depressivo e do tipo maníaco e de estresse oxidativo em roedores.

**Palavras-chave:** Transtorno depressivo maior; transtorno bipolar; estresse; mania; n-acetilcisteína; deferoxamina



## ABSTRACT

Mood disorders are considered important causes of morbidity and mortality worldwide. Major depressive disorder (MDD) and bipolar disorder (BD) are among the two most prevalent and severe mood disorders. In addition, a large proportion of psychiatric patients affected with these disorders do not satisfactorily respond to available drugs. Studies suggest the involvement of different pathophysiological mechanisms, among them is oxidative stress. Therefore, this study examined the effects of antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and/or deferoxamine (DFX) on behavior parameters and oxidative stress in the brain of rodents subjected to an animal model of depression induced by chronic mild stress (CMS) in rats or an animal model of mania induced by paradoxal sleep deprivation (PSD) in mice. The animals were treated for seven days with saline (SAL), NAC, or NAC + DFX, and subjected to CMS or PSD protocols. After the locomotor activity testing and sweet food consumption in the CMS protocol or locomotor activity on the PSD protocol, brain tissue samples were dissected from animals of both protocols and used to evaluate the oxidative stress parameters. Behavioral results showed that CMS induced anhedonia in rats and PSD induced hyperactivity in mice, behaviors depressive-like and manic-like, respectively. In addition, CMS and PSD protocols increased lipid peroxidation and oxidative damage to proteins and changes in antioxidant enzymes in rodent brain tissue. Taken together, these results suggest that the combined treatment of NAC and DFX may be effective in the treatment of depression-like and manic-like behavioral symptoms and oxidative stress in rodents.

**Keywords:** Major depressive disorder; bipolar disorder; stress; mania; n-acetylcysteine; deferoxamine



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema mostrando o desenho experimental do modelo animal de depressão induzido pelo estresse crônico moderado (ECM), tratamento de sete dias com antioxidantes (NAC e/ou DFX) e os testes comportamentais de consumo de alimento doce (teste de anedonia) e de atividade locomotora (teste do campo aberto). ..... **39**
- Figura 2.** Esquema mostrando o desenho experimental do modelo animal de mania induzido pela privação do sono paradoxal (PSP), tratamento de sete dias com antioxidantes (NAC e/ou DFX) e o teste comportamental de atividade locomotora (teste do campo aberto). .....**40**
- Figura 3.** Teste do Campo Aberto. Avaliação da atividade locomotora (A) e do consumo de alimento doce (B) após o tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em ratos submetidos ao ECM. ....**46**
- Figura 4.** Teste de campo aberto. Avaliação da atividade locomotora após o tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em camundongos submetidos à PSP. ....**47**
- Figura 5.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em Superóxido em partículas submitocondriais (A), TBARS em partículas submitocondriais (B) e TBARS em tecido total (C) no hipocampo, córtex frontal e amígdala de ratos submetidos ao ECM. ....**48**
- Figura 6.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em HPL (A), TBARS (B) e 4-HNE (C) no hipocampo e córtex frontal de camundongos submetidos à PSP. ....**49**
- Figura 7.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em proteínas carboniladas no hipocampo, córtex frontal e amígdala de ratos submetidos ao ECM. ....**50**
- Figura 8.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em proteínas carboniladas (A) e 3-nitro (B) no hipocampo e córtex frontal de camundongos submetidos à PSP. ....**51**

**Figura 9.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX sobre a atividade da SOD e da CAT no hipocampo, córtex frontal e amígdala de ratos submetidos ao ECM. ....52

**Figura 10.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX sobre a atividade da glutathione peroxidases (GPx) (A) e sobre a atividade da glutathione reductase (GR) (B) no hipocampo e córtex frontal de camundongos submetidos a PSP. ....53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estressores utilizados durante o protocolo de ECM. ....	<b>38</b>
--	-----------



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**3-Nitro** – 3-Nitrotirosina

**AMPc** - Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês *Cyclic adenosine monophosphate*)

**4-HNE** – 4-hidroxinonenal

**ATP** – Trifosfato de adenosina (do inglês *Adenosine triphosphate*)

**BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain derived neurotrophic factor*)

**CAT** - Catalase

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

**DFX** – Deferoxamina

**DNPH** - Dinitrofenil-hidrazina (do inglês *Dinitrophenylhydrazine*)

**DSM-IV** – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

**ECM** – Estresse crônico moderado

**EROs** - Espécies reativas de oxigênio

**GPx** - Glutaciona peroxidase

**GR** – Glutaciona redutase

**GSH** – Glutaciona reduzida

**GSK-3** - Glicogênio sintase quinase-3 (do inglês *Glycogen synthase kinase*)

**GSSG** – Glutaciona oxidada

**HPL** – Hidroperóxido lipídico

**MAPK** – Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*)

**NAC** – N-acetilcisteína

**NMDA** – N-metil-D-aspartato (do inglês *D-aspartato-metil-N*)

**PKA** – Proteína cinase A (do inglês *Protein kinase A*)

**PKC** – Proteína cinase C (do inglês *Protein kinase C*)

**PSM** – Partículas submitocondriais

**PSP** – Privação do sono paradoxal

**SAL** – Solução salina

**SOD** - Superóxido dismutase

**TB** – Transtorno bipolar

**TBARS** – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)

**TDM** – Transtorno depressivo maior



# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	25
<b>1.1 Transtornos do Humor.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2 Transtorno Depressivo Maior (TDM).....</b>	<b>26</b>
1.3 Transtorno Bipolar (TB).....	27
<b>1.4 Estresse Oxidativo e os Transtornos do Humor.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5 N-Acetilcisteína (NAC) e Deferoxamina (DFX) .....</b>	<b>30</b>
<b>1.6 Modelos Animais de Transtorno do Humor .....</b>	<b>31</b>
2 OBJETIVOS .....	34
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>34</b>
3 METODOLOGIA .....	36
<b>3.1 Aspectos Éticos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Animais Experimentais .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Tratamentos .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Protocolo Experimental.....</b>	<b>37</b>
3.4.1 <i>Protocolo de estresse crônico moderado .....</i>	37
3.4.2 <i>Protocolo de privação do sono paradoxal .....</i>	39
<b>3.5 Avaliações Comportamentais .....</b>	<b>41</b>
3.5.1 <i>Atividade Locomotora .....</i>	41
3.5.2 <i>Consumo de alimento doce (Teste de Anedonia) .....</i>	41
<b>3.6 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de roedores .....</b>	<b>41</b>
3.6.1 <i>Amostras cerebrais .....</i>	41
3.6.2 <i>Homogeneização .....</i>	42
3.6.3 <i>Isolamento de Mitocôndrias .....</i>	42
3.6.4 <i>Produção de superóxido em partículas submitocondriais .....</i>	42
3.6.5 <i>Peroxidação lipídica .....</i>	42

3.6.6 Oxidação e nitração proteica .....	43
3.6.7 Atividade de enzimas antioxidantes .....	44
3.6.8 Determinação de proteínas.....	44
<b>3.7 Análises Estatísticas .....</b>	<b>44</b>
4 RESULTADOS.....	45
5 DISCUSSÃO .....	55
6 CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO 1 .....	83
ANEXO 2 .....	84
ANEXO 3 .....	85

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Transtornos do Humor

Nas últimas décadas os transtornos do humor vêm sendo considerados como importantes causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, constituindo uma enorme e crescente problemática tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Harris e Barraclough, 1998; Hiroeh et al., 2001; Lim et al., 2012). O transtorno depressivo maior (TDM) e o transtorno bipolar (TB) são considerados pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) como os dois mais severos e prevalentes transtornos do humor (Jorge, 2003). Ambos são caracterizados por extremas alterações do humor com importante comprometimento social, cognitivo e funcional (Murray e Lopez, 1997; Aas et al., 2012). Além disso, no recém-lançado DSM-V (American Psychiatric Association, 2013), o TB adquire um capítulo próprio, onde é dada maior ênfase às alterações no nível de atividades e de energia, além de permitir estados mistos tanto para o TB quanto para a TDM (Angst, 2013).

Estudos clínicos relatam uma diminuição significativa na densidade neuronal e glial de pacientes com transtornos psiquiátricos, principalmente em áreas do cérebro envolvidas com a regulação do humor e da cognição (Manji et al., 2001; Brisch et al., 2011; Matthews e Harrison, 2012; Maletic e Raison, 2014). A cada fase sintomática desses transtornos há a ocorrência de alterações neuroquímicas cerebrais, que podem levar ao dano neuronal e glial, deixando os pacientes com uma maior propensão à ocorrência de novas crises e, conseqüentemente, ao declínio cognitivo e funcional (Ferrier et al., 1999; Clark et al., 2002; Martocchia et al., 2011; Vieta et al., 2012).

Além disso, uma grande parcela dos pacientes psiquiátricos acometidos com esses transtornos não apresentam resposta satisfatória aos fármacos atualmente disponíveis. O tempo prolongado para a obtenção das primeiras respostas à terapia farmacológica e/ou inadaptação ao vasto número de efeitos colaterais também contribuem negativamente para a não aderência ao tratamento por parte dos pacientes (Gitlin, 2006; Zarate et al., 2006; Souery et al., 2007; Hashimoto et al., 2012; Kasper, 2014). Levando em consideração esses

fatos, a profilaxia dessas crises é de extrema importância para o tratamento dos transtornos do humor e, conseqüentemente, para a melhora da qualidade de vida desses pacientes.

## **1.2 Transtorno Depressivo Maior (TDM)**

O TDM apresenta uma prevalência durante a vida de 2% a 15%, sendo um dos fatores de risco mais importantes para a incapacidade. Além disso, esse transtorno foi considerado o mais incidente em 2010 (Lim et al., 2012; Murray et al., 2012; Patton et al., 2014). De acordo com o DSM-IV (Jorge, 2003), a característica essencial do TDM é a permanência de humor deprimido e/ou perda de interesse ou prazer em quase todas as atividades, durante um período de pelo menos duas semanas. Além disso, sintomas como alteração do apetite e peso, distúrbio do sono, sentimento de culpa, dificuldade de pensar, falta de energia e ideias suicidas também constituem o diagnóstico de TDM.

Os principais antidepressivos utilizados na clínica para o tratamento do TDM são os inibidores da monoamino oxidase (ex. tranilcipromina e moclobemida), os inibidores não seletivos da recaptação de monoaminas (ex. tricíclicos, venlafaxina, duloxetina e bupropiona), os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ex. fluoxetina, paroxetina e citalopram) e os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ex. reboxetina e desipramina) (Mathew et al., 2008). Apesar da diversidade de fármacos para o tratamento do TDM, os tratamentos disponíveis estão aquém do ideal (Machado-Vieira et al., 2010). Isso está relacionado ao fato de que o período de resposta terapêutica para que se obtenham os primeiros benefícios clínicos é longo, sendo compreendido entre 3-5 semanas (Juli e Juli, 2014). Outro entrave relacionado ao tratamento do TDM são os inúmeros efeitos colaterais como diminuição ou perda da libido, insônia, dor de cabeça, ganho ou perda de peso. (Anderson et al., 1996; Berton e Nestler, 2006; Holtzheimer e Nemeroff, 2006). Em virtude disto, se faz necessária a busca por novos fármacos com ação rápida, além de mais seguros e efetivos para o tratamento do TDM (Berton e Nestler, 2006; Juli e Juli, 2014).

São muitos os sistemas que parecem estar envolvidos na fisiopatologia do TDM, no entanto, podemos citar alguns como o sistema monoaminérgico, glutamatérgico e GABAérgico (Nakagawa et al., 1996). Além disso, o TDM pode ser desencadeado também por alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a

sobrevivência celular como a proteína cinase C (PKC), proteína cinase A (PKA), elemento de resposta ao AMPc (CREB) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Manji et al., 2000; Dwivedi et al., 2003; Pittenger e Duman, 2008; Yu e Chen, 2011). Outro mecanismo que também está amplamente relacionado à fisiopatologia do TDM é o estresse oxidativo (Ozcan et al., 2004; Sahin e Gumuslu, 2004; Zafir et al., 2009; Maes et al., 2011; Moylan et al., 2014). Esta evidência baseia-se no aumento do dano oxidativo e na redução de enzimas antioxidantes no sistema nervoso central em pacientes com TDM (Maes et al., 2011a).

### **1.3 Transtorno Bipolar (TB)**

Um estudo atual demonstrou que nos EUA o TB apresenta a prevalência de 1,4%, iniciando, principalmente, após os 12 anos de idade (Brus et al., 2014). Outro dado relevante é a taxa de risco de suicídio, que pode chegar a 15%, com incidência maior também em indivíduos mais jovens (Shastry, 2005). O TB é considerado um transtorno psiquiátrico grave, caracterizado por alterações patológicas do humor, alternando entre episódios recorrentes de mania, hipomania e/ou depressão (Belmaker, 2004; Baek et al., 2011; Subramaniam et al., 2013).

A mania é um estado do humor elevado, durante o qual o paciente permanece expansivo ou irritável pelo período mínimo de sete dias. O episódio hipomaníaco apresenta os mesmos critérios do episódio maníaco, entretanto, com duração mínima de quatro dias. O diagnóstico pelo DSM-IV requer que estas alterações do humor, tanto na mania quanto na hipomania, sejam seguidas por pelo menos três sintomas adicionais como autoestima inflada ou grandiosidade, diminuição da necessidade de sono, fuga de ideias, agitação psicomotora e comportamentos de risco (Jorge, 2003).

Durante os episódios depressivos, o paciente apresenta o humor deprimido e/ou anedonia acompanhado por perda ou ganho importante de peso, insônia ou hipersonia, retardo ou agitação psicomotora, fadiga ou perda da energia, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, dificuldade para concentrar-se e pensamentos de morte ou ideação suicida. O conjunto de cinco ou mais desses critérios devem estar presentes por pelo menos duas semanas, além de comprometer o

funcionamento social e/ou ocupacional do paciente para compor diagnóstico para o TB (Jorge, 2003).

O lítio, único fármaco aprovado para o TB, é ainda o fármaco de primeira escolha para o tratamento do TB. Também são utilizados na clínica anticonvulsivantes e antipsicóticos de segunda geração (Manji e Zarate, 2002; Haddad et al. 2009; Tohen e Vieta 2009). Entre os anticonvulsivantes encontra-se o valproato, o qual foi o primeiro fármaco a demonstrar efeito estabilizador de humor após a descoberta do lítio. O valproato mostrou menores taxas de descontinuação do tratamento em relação ao lítio (Bowden et al., 2000). Um dos principais antipsicóticos utilizado para o tratamento do TB é a clozapina. Este fármaco possui maior eficácia nas fases maníacas em relação às fases depressivas graves. No entanto, o tratamento com clozapina causa diversos efeitos colaterais, o que dificulta sua empregabilidade no tratamento do TB (Zarate et al., 1995).

Um estudo mostrou que mais de 60% dos pacientes bipolares tratados com lítio responderam ao tratamento (Scott e Pope, 2002). Neste sentido, estudos mostram que a terapia com o lítio manifesta diversos efeitos colaterais como toxicidade por metal pesado, confusão mental, convulsões, hipotireoidismo e insuficiência renal (Goodwin, 2009; McKnight, 2012; Okada, 2014). Essa grande quantidade e severidade de efeitos colaterais é a principal causa da não adesão ao tratamento no TB, dificultando a manutenção da farmacoterapia, levando a recorrências de episódios maníacos e depressivos, necessidade de hospitalização e até mesmo suicídio (Greenhouse et al., 2000).

Diferentes sistemas e vias intracelulares podem explicar a fisiopatologia do TB como o sistema glutamatérgico (Yildiz-Yesiloglu e Ankerst, 2006), vias de sinalização envolvendo as proteínas da família da Bcl-2 (Marx et al., 2008), PKC (Manji e Lenox, 1999), glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) (Zhao et al., 2007), BDNF (Manji e Duman, 2001) e estresse oxidativo (Stork e Renshaw, 2005). Estudos apontam para um aumento nos produtos da peroxidação lipídica e da inibição da atividade das principais enzimas antioxidantes no sangue de pacientes com TB, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia do TB (Kuloglu et al., 2002; Ozcan et al., 2004). Além disso, alterações no ciclo sono/vigília são relatadas por pacientes com TB, nos quais os níveis de melatonina durante o dia estão mais elevados em comparação com controles saudáveis e pacientes em fase depressiva (Nováková et al., 2014).

## 1.4 Estresse Oxidativo e os Transtornos do Humor

Radicais livres são átomos ou grupos de átomos com o número de elétrons desemparelhados altamente reativos (Halliwell, 2007). A fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias e é a principal fonte de adenosina trifosfatase (ATP) de organismos aeróbios. Como subproduto deste processo, há a produção de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (Pero et al., 1990).

O processo de redução de oxigênio em água gera EROs como intermediários, que podem causar danos às células (Davies, 2005). As principais EROs geradas em humanos são o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). O  $O_2^{\cdot -}$  é gerado durante a auto-oxidação da hemoglobina, sendo particularmente não reativo, por si só, mas podendo ser cataliticamente convertido pela superóxido dismutase (SOD) em  $H_2O_2$ , que se decompõe para produzir  $OH^{\cdot}$ , que na presença de ferro torna-se altamente reativo. O  $O_2^{\cdot -}$  e o  $H_2O_2$ , que são exemplos de EROs, podem ser neutralizados por enzimas antioxidantes como a SOD, glutatona peroxidase (GPx) ou catalase (CAT) (Fridovich, 1983; Butterfield et al., 2002; Calabrese et al., 2002). Além disso, a GPx e glutatona redutase (GR) estão incluídas entre as principais enzimas antioxidantes, que estão diretamente envolvidas na neutralização de EROs. A GPx remove  $H_2O_2$ , utilizando-o para oxidar a glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG). Por sua vez, GR regenera de GSH a GSSG, com NADPH como uma fonte de poder redutor (Valko et al., 2007; Andriantsitohaina et al., 2012; Birden et al., 2012).

Com o balanço redox equilibrado, as EROs são benéficas para as funções fisiológicas normais e protegem a célula contra infecções destruindo agentes patogênicos invasores, atuando como segundos mensageiros na regulação das células cardíacas e vasculares em funcionamento. Também estão envolvidas na regulação da concentração de cálcio intracelular e na fosforilação de proteínas (Griendling et al., 2000; Kotamraju et al., 2004; Halliwell, 2006; Valko et al., 2007).

De modo geral, qualquer aumento anormal de estresse oxidativo promovido por uma substância, denominada de pró-oxidante, pode ser atenuado por uma resposta antioxidante. Assim, este equilíbrio “pró-oxidante/antioxidante” torna-se fundamental para a célula. Quando este

equilíbrio é desestabilizado há uma produção excessiva de EROs e/ou deficiência dos mecanismos de defesa antioxidante, podendo causar danos a lipídios, proteínas e ao DNA (Dröge, 2002; Kohen e Nyska, 2002; Berg et al., 2004).

Diversos estudos demonstram que as EROs estão implicados em vários transtornos psiquiátricos, como o TDM (Maes et al., 2011a, b; Teyssier et al., 2011) e o TB (Steckert et al., 2010; Budni et al., 2013; Siwek et al., 2013; Brown et al., 2014; de Sousa et al., 2014). Isto pode ser explicado pelo fato de que o tecido cerebral é mais vulnerável aos efeitos de EROs pois apresenta uma taxa metabólica elevada e baixos níveis de antioxidantes (Forlenza e Miller, 2006).

A relação entre o estresse oxidativo no TDM tem sido mostrada em estudos pré-clínicos e clínicos. Pacientes com TDM mostraram aumento do estresse oxidativo em soro e plasma (Forlenza e Miller, 2006; Galecki et al., 2009a, b; Maes et al., 2009). Além disso, em estudos com roedores submetidos ao modelo de estresse crônico moderado (ECM), foram observados aumentos de peroxidação lipídica e de ânion superóxido, além de aumento da atividade das enzimas antioxidantes, CAT e SOD, em tecido cerebral (Lucca et al., 2009a, b). Em soro de pacientes bipolares também foi observado um aumento do estresse oxidativo (de Sousa et al., 2014). Estudos prévios, usando modelos animais de mania, induzidos por ouabaína (Riegel et al., 2010) ou por anfetamina (Frey et al., 2006), foi observado aumento dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da formação de proteínas carbonilas em tecido cerebral em ambos os modelos de mania. Em conjunto, estes estudos evidenciam o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia dos transtornos de humor como o TDM e TB.

### **1.5 N-Acetilcisteína (NAC) e Deferoxamina (DFX)**

A N-acetilcisteína (NAC) é um agente farmacológico antioxidante que age contra a degeneração celular. A NAC é ainda precursora na síntese do antioxidante glutationa, que é reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos seres vivos desempenhando um papel fundamental na homeostase celular (De Flora et al., 1991). A falta de glutationa é acompanhada de morte celular que ocorre devido à peroxidação lipídica (Reed e Fariss, 1984). Assim, a NAC age mimetizando a atividade da glutationa peroxidase (Maes et al., 2011a). Além disso, a NAC também atua diretamente sobre as EROs, levando a proteção contra o dano oxidativo (Aruoma et al., 1989).

Estudos prévios mostram que a NAC previne a hiperatividade induzida por meta-anfetamina em ratos e também promove neuroproteção no estriado desses animais, pela diminuição dos níveis de dopamina (Fukami et al., 2004). Outro estudo relata que os níveis de glutatona no estriado de ratos estão diminuídos após uma dose neurotóxica de meta-anfetamina, indicando o envolvimento do estresse oxidativo nesta neurotoxicidade (Moszczynska et al., 1998). Além disso, estudos clínicos demonstraram efeitos da NAC contra os episódios depressivos no TB (Berk et al., 2008, 2011; Magalhães et al., 2011), sugerindo uma utilização em potencial para a NAC, não somente no TB, mas também em casos de TDM. Além disso, a NAC também atua sobre os sistemas glutamatérgico e dopaminérgico, que estão bem estabelecidos como vias envolvidas no TDM (Malhi e Berk, 2007; Réus et al., 2010, 2011, 2012; Maes et al., 2012).

A deferoxamina (DFX) é um potente quelante de ferro que pode inibir reações com radicais livres dependentes de ferro. A DFX também protege contra o dano neuronal induzido por meta-anfetamina, diminuindo o nível de estresse oxidativo no cérebro de ratos (Park et al., 2006). Estudos mostram que a DFX diminuiu o dano oxidativo em modelos animais de doenças cerebrais, como lesão isquêmica e isquemia cerebral focal (Prass et al., 2002; Mu et al., 2005). Outro estudo do nosso grupo de pesquisa mostrou que NAC, DFX e a combinação de ambos preveniram e reverteram o dano oxidativo à proteína induzido pela administração de dextro-anfetamina (Valvassori et al., 2008).

A melhora da resiliência e da plasticidade neuronal com consequente melhora cognitiva e funcional é de suma importância no tratamento do TB e conduziria para uma melhor qualidade de vida a esses pacientes. A NAC, a DFX e/ou a associação desses antioxidantes podem ser considerados tratamentos profiláticos promissores tanto para o TB quanto para o TDM, por proteger o cérebro contra o dano oxidativo e morte celular. Contudo, estudos avaliando os efeitos dessas substâncias nesses transtornos são de extrema importância para avaliar e melhor caracterizar seus efeitos terapêuticos e profiláticos.

## **1.6 Modelos Animais de Transtorno do Humor**

Os estudos de neuroimagem estão contribuindo para o refinamento de pesquisas sobre transtornos do humor, embora na clínica, sejam insuficientes para diagnosticar esses transtornos. Deste

modo, faz-se necessária a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos transtornos do humor (Valvassori et al., 2011). Para isso, a pesquisa pré-clínica é de extrema importância para o melhor entendimento da fisiopatologia desses transtornos, incluindo os modelos animais. Os modelos animais tem finalidade de avaliar a segurança e eficácia de novos fármacos, estudar o mecanismo de ação de psicofármacos e ajudar na elucidação da neurobiologia dos transtornos psiquiátricos. Além disso, estes estudos são, na maioria das vezes, inviáveis em humanos (Rodgers et al., 1997; Weiss e Kilts, 1998).

Para a validação de modelos animais para o estudo dos transtornos psiquiátricos, estes devem apresentar três características principais: (I) mimetizar sintomas clínicos do determinado transtorno, (II) apresentar aspectos fisiopatológicos do transtorno e por fim, (III) agentes terapêuticos utilizados na clínica devem reverter os sintomas induzidos no modelo animal utilizando. Estes aspectos são denominados, respectivamente, validade de face, validade de constructo e validade preditiva. Deste modo, um modelo animal ideal é aquele capaz de contemplar esta tríade (Ellenbroek e Cools, 1990).

### *1.6.1 Modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado (ECM)*

O modelo animal de estresse crônico moderado, adaptado de Gamaro et al. (2003) consiste em gerar comportamentos do tipo depressivo em ratos, após um período de 40 dias com aplicação de estressores diversos e moderados. Estudos demonstraram que os animais submetidos a este protocolo de estresse desenvolveram comportamento anedônico, diminuindo o consumo de sacarose, e, além disso, apresentaram alterações fisiológicas, como diminuição no peso, aumento na glândula adrenal e dos níveis do hormônio adrenocorticotrófico e corticosterona, e ainda, esses efeitos puderam ser revertidos por antidepressivos clássicos (Casarotto e Andreatini, 2007). Com base nestes resultados, este pode ser considerado um modelo animal de depressão adequado, já que contempla os três critérios para a validade de um modelo animal psiquiátrico.

### *1.6.2 Modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP)*

O modelo animal de mania induzido por privação de sono paradoxal (PSP) em roedores é considerado um bom modelo animal de mania, pois é capaz de induzir aspectos miméticos de episódios maníacos, como a hiperatividade e comportamento agressivo (Gessa, 1995; Benedetti et al., 2008). Outro estudo demonstrou com sucesso a reversão de sintomas maníacos induzidos pela PSP com o tratamento combinado de tamoxifeno e lítio (Armani et al., 2012). De fato, o PSP pode induzir episódios de mania em sujeitos saudáveis e agravar episódios maníacos ou levar a uma “virada” maníaca em pacientes bipolares (Kaplan e Harvey, 2013). Além disso, Reimund (1994) descreveu que o sono possui função antioxidante, o que conduz à hipótese de que o PSP pode ser associado ao estresse oxidativo (Everson et al., 1994). Em conjunto, estes resultados confirmam o PSP como um bom modelo animal de mania, pois o modelo contempla os três critérios para a validade de um modelo animal psiquiátrico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre o comportamento e parâmetros de estresse oxidativo em modelos animais de depressão e mania.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre os parâmetros comportamentais de anedonia, atividade locomotora e exploratória em um modelo animal de depressão induzido por ECM em ratos;
- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre os parâmetros de estresse oxidativo pela produção de superóxido em partículas submitocondriais em um modelo animal de depressão induzido por ECM em ratos;
- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em um modelo animal de depressão induzido por ECM em ratos;
- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre a oxidação de proteínas (Proteína carbonila) em um modelo animal de depressão induzido por ECM em ratos;
- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre a atividade das enzimas antioxidantes (CAT e SOD) em um modelo animal de depressão induzido por ECM em ratos;
- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre os parâmetros comportamentais de atividade locomotora e exploratória em um modelo animal de mania induzido por PSP em camundongos;
- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre a peroxidação lipídica (Hidroperóxido lipídico (LPH), TBARS e 4-hidroxinonal (4-HNE) em um modelo animal de mania induzido por PSP em camundongos;

- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre a oxidação e nitração proteica (Carbonilação de proteínas e 3-Nitrotirosina) em um modelo animal de mania induzido por PSP em camundongos;
- Avaliar os efeitos da NAC e/ou DFX sobre a atividade das enzimas antioxidantes (GPx e GR) em um modelo animal de mania induzido por PSP em camundongos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Aspectos Éticos

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense (15/2010 (Anexo 1), 70/2012 (Anexo 2) com adendo/2013 (Anexo 3)). Todos os experimentos deste projeto foram realizados nos Laboratórios de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

#### 3.2 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (pesando entre 250 - 350 g) para o modelo animal de depressão induzido por ECM e camundongos C57bl/6 machos (pesando entre 18 – 25 g), ambos com 60 dias de vida e procedentes do biotério da Unesc. Os roedores foram mantidos em cinco animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12h (07:00 às 19:00) com comida e água à vontade. O ambiente foi mantido a temperatura de  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ .

#### 3.3 Tratamentos

Foram injetados por via subcutânea (sc; na área posterior do pescoço) pelo período de sete dias (tratamento crônico) solução salina (SAL, NaCl 0,09%, 1 ml/kg, 3 injeções ao dia, sc), n-acetilcisteína (NAC, 20mg/kg, 3 injeções ao o dia, sc), deferoxamina (DFX, 20 mg/kg, uma injeção a cada 3 dias, sc) ou NAC associado com DFX.

### 3.4 Protocolo Experimental

#### 3.4.1 Protocolo de estresse crônico moderado

O protocolo de ECM foi adaptado a partir do procedimento descrito por Gamaro et al. (2003). Os animais foram divididos em dois grupos: controle e estressado. O grupo controle foi mantido sem estressores em suas gaiolas durante os 40 dias do protocolo, recebendo cuidados rotineiros do biotério. O protocolo de ECM foi utilizado para os animais do grupo estressado.

Foram utilizados os seguintes estressores: (I) 24 horas de privação de alimentos; (II) 24 horas de privação de água; (III) 1-3h de contenção nos dias; (IV) 1,5-2h de contenção a 4°C; (V) a natação forçada por um período de 10-15 minutos, (VI) exposição ao piscar da luz (lâmpada estroboscópica) por 120-210 minutos e (VII) 24 horas de isolamento, aplicados conforme a **Tabela 1**. Os estímulos estressores foram aplicados em momentos diferentes a cada dia, a fim de minimizar a sua previsibilidade.

O estresse de contenção constituiu em colocar o animal em um tubo de plástico de 25 x 7 cm e ajustado com fita tipo esparadrapo no lado de fora do tubo, de modo que o animal fosse incapaz de se mover. Havia também uma abertura de 1 cm na outra extremidade para a respiração normal do animal.

A natação forçada foi realizada colocando o animal em um tanque de vidro cuja medida foi 50 x 47 cm com 30 cm de água a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , em que o animal não pudesse tocar o fundo.

A exposição ao piscar da luz foi realizada colocando o animal em uma caixa de madeira compensada 60 x 60 x 25 cm dividido em 16 células de 15 x 15 x 25 cm com uma parede de vidro frontal. Uma lâmpada de 40 w, piscando na frequência de 60 *flashes*/minuto.

No dia seguinte ao término do protocolo de ECM foi iniciado o tratamento com os antioxidantes por sete dias. Neste dia também foi iniciado o teste do consumo de alimento doce, sendo que, do primeiro ao quinto dia foram realizadas as habituações; no sexto dia foi realizado o teste 1. No sétimo dia foi realizado o teste de campo aberto, onde foram avaliados além do consumo de alimento doce (teste 2), o número de *crossings*.

**Tabela 1:** estressores utilizados durante o protocolo de estresse crônico moderado (ECM).

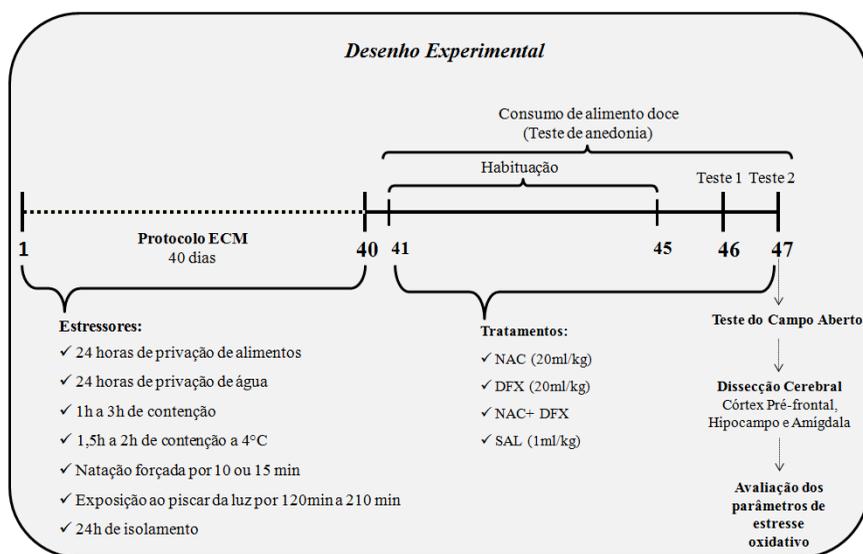
<b>Dia do estressor</b>	<b>Estressor</b>	<b>Duração</b>	<b>Hora do dia</b>
Dia 1	Privação de água	24h	8:00
Dia 2	Privação de comida	24h	13:00
Dia 3	Isolamento	24h	16:00
Dia 4	Isolamento	24h	-
Dia 5	Isolamento	24h	-
Dia 6	Luz piscando	3h	9:00
Dia 7	Privação de comida	24h	16:00
Dia 8	Contenção	1h	10:00
Dia 9	Privação de água	24h	14:00
Dia 10	Nenhum estressor	-	-
Dia 11	Nenhum estressor	-	-
Dia 12	Contenção + Frio	1.5h	8:00
Dia 13	Luz piscando	2.5h	13:00
Dia 14	Privação de comida	24h	9:00
Dia 15	Isolamento	24h	15:00
Dia 16	Isolamento	-	-
Dia 17	Isolamento	-	-
Dia 18	Privação de água	24h	10:00
Dia 19	Privação de comida	24h	14:00
Dia 20	Luz piscando	2h	16:00
Dia 21	Contenção	1.5h	9:00
Dia 22	Isolamento	24h	8:00
Dia 23	Isolamento	24h	-
Dia 24	Isolamento	24h	-
Dia 25	Contenção + Frio	1h	14:00
Dia 26	Luz piscando	2h	13:00
Dia 27	Privação de água	24h	9:00
Dia 28	Nenhum estressor	-	-
Dia 29	Privação de comida	24h	10:00
Dia 30	Contenção	2h	14:00
Dia 31	Privação de água	24h	9:00
Dia 32	Isolamento	24h	10:00
Dia 33	Isolamento	24h	-
Dia 34	Isolamento	24h	-
Dia 35	Luz piscando	3h	14:00
Dia 36	Nenhum estressor	-	-
Dia 37	Privação de comida	24h	8:00
Dia 38	Privação de água	24h	8:00
Dia 39	Contenção + Frio	1,5h	15:00
Dia 40	Luz piscando	3h	11:00

Fonte: do autor.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n = 10 por grupo), conforme a lista a seguir:

- |                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| (1) Controle x SAL+SAL | (5) ECM x SAL+SAL |
| (2) Controle x NAC+SAL | (6) ECM x NAC+SAL |
| (3) Controle x SAL+DFX | (7) ECM x SAL+DFX |
| (4) Controle x NAC+DFX | (8) ECM x NAC+DFX |

**Figura 1.** Esquema mostrando o desenho experimental do modelo animal de depressão com a aplicação do protocolo de estresse crônico moderado (ECM), tratamento de sete dias com antioxidantes (NAC e/ou DFX) e os testes comportamentais de consumo de alimento doce (teste de anedonia) e de atividade locomotora (teste do campo aberto). N= 10 animais por grupo.



Fonte: do autor.

### 3.4.2 Protocolo de privação do sono paradoxal

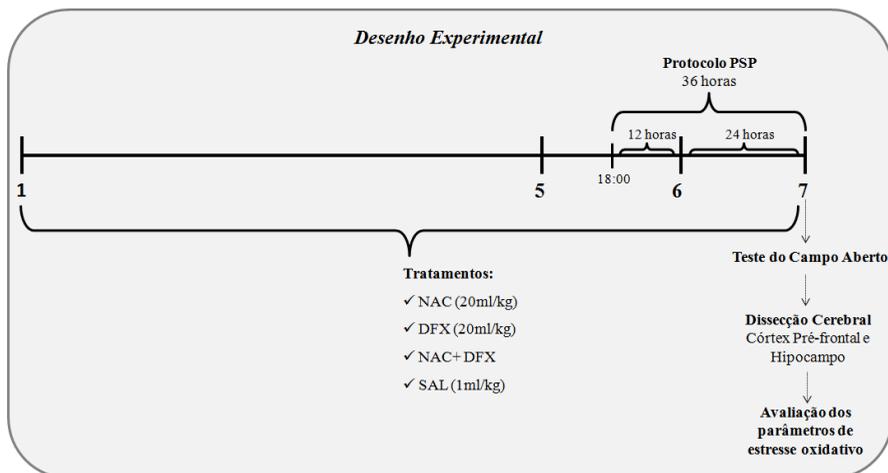
O protocolo de PSP foi adaptado a partir do procedimento descrito por Tufik et al. (2009). A PSP começou no quinto dia (às 18:00) de tratamento com os antioxidantes (ver **Figura 2**). Os camundongos do grupo privado foram colocados em número de 5 por gaiola (38 x 31 x 17 cm) contendo 12 plataformas (3,5 centímetros) de diâmetro. Na mesma caixa foi colocado o volume de 1 polegada de água obrigando os

animais a permanecer nas plataformas e podendo se deslocar de uma plataforma para outra. Assim, quando os animais entraram na fase de sono paradoxal, devido à atonia muscular, eles eram despertados por caírem na água. A comida e água estavam disponíveis à vontade. Este protocolo teve duração de 36h. Os animais foram divididos em dois grupos: controle e privados. O grupo controle foi exposto às mesmas condições, exceto pela presença de água no fundo da caixa. Para a administração do tratamento durante protocolo PSP os animais foram removidos da plataforma e recolocados imediatamente após cada injeção.

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n = 10 por grupo), que estão listados abaixo:

- |                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| (1) SAL+SAL x Controle | (5) SAL+SAL x PSP |
| (2) NAC+SAL x Controle | (6) NAC+SAL x PSP |
| (3) SAL+DFX x Controle | (7) SAL+DFX x PSP |
| (4) NAC+DFX x Controle | (8) NAC+DFX x PSP |

**Figura 2.** Esquema mostrando o desenho experimental do modelo animal de mania com a aplicação do protocolo de privação do sono paradoxal (PSP), tratamento de sete dias com antioxidantes (NAC e/ou DFX) e o teste comportamental de atividade locomotora (teste do campo aberto). N= 10 animais por grupo.



Fonte: do autor.

### 3.5 Avaliações Comportamentais

#### 3.5.1 Atividade Locomotora

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais em ambos os protocolos. A fim de realizar este teste, um aparelho que consiste de uma caixa de madeira compensada branca com dimensões de 40 x 60 x 50 cm, sendo a parede frontal de vidro. O assoalho foi dividido em nove partes iguais (15 x 20 cm/por parte). Os animais foram colocados cuidadosamente no quadrante anterior esquerdo, a fim explorar o ambiente por 3 minutos (ECM) e 5 minutos (PSP), onde foram contados os cruzamentos entre os quadrantes (*crossing*).

#### 3.5.2 Consumo de alimento doce (Teste de Anedonia)

Após o protocolo de ECM, o consumo de alimentos doces foi medido para verificar a anedonia. Os animais foram submetidos a 5 sessões de 3 minutos cada, uma vez ao dia, a fim de tornar-se familiarizado com este alimento. Depois de estarem habituados, os animais foram expostos a duas sessões de teste, também de 3 minutos cada e uma vez ao dia, em que o número de péletes ingeridos foi contado. Os valores obtidos no teste 1 e no teste 2 foram somados e então, calculada a média de consumo conforme a equação a seguir. (Katz et al., 1981; Kosten et al., 2008; Lucca et al., 2009b).

$$\text{Média}_{\text{consumo}} = \frac{\text{Teste 1} + \text{Teste 2}}{2}$$

### 3.6 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de roedores

#### 3.6.1 Amostras cerebrais

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação, o cérebro foi dissecado em córtex frontal (ECM e PSP), hipocampo (ECM e PSP) e amígdala (ECM). As amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até serem analisadas.

### 3.6.2 Homogeneização

As amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas em três diferentes soluções-tampão  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  KCl; KCl  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  e PBS com 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e 1 mM (EGTA).

### 3.6.3 Isolamento de Mitocôndrias

Os homogenatos de cérebro de rato foram centrifugados a 700g por 10 minutos para eliminar os núcleos e os resíduos celulares. Então, o sedimento foi lavado para enriquecer o sobrenadante que foi centrifugado a 700g por 10 minutos. As partículas submitocondriais (PSM) foram obtidas pelo congelamento e descongelamento (três ciclos) das mitocôndrias isoladas. Para medições da produção de superóxido, as PSM foram lavadas duas vezes com KCl 140 mM, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) e suspensas no mesmo meio (Boveris et al., 1972).

### 3.6.4 Produção de superóxido em partículas submitocondriais

A produção de superóxido foi determinada em PSM de tecido cerebral cérebro lavado usando um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação dependente de superóxido da epinefrina para adrenocromo a 37 °C ( $\epsilon_{480\text{nm}}=4.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). O meio de reação consistiu em 0,23 M de manitol, 0,07 M de sacarose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), o SMP (0,3-1,0 mg de proteína/ml), 0,1  $\mu\text{M}$  catalase, e 1 mM de epinefrina. NADH (50  $\mu\text{M}$ ) e succinato (7 mM) foram usadas como substratos e rotenona (1  $\mu\text{M}$ ) e antimicina (1  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados como inibidores específicos, respectivamente, para ensaiar a produção de  $\text{O}^{2-}$  no NADH desidrogenase e na região b-citocromo da ubiquinona. A superóxido-dismutase foi utilizada no 0,1 - 0,3  $\mu\text{M}$  concentração final de ensaio para dar especificidade (Boveris, 1984).

### 3.6.5 Peroxidação lipídica

#### 3.6.5.1 Hidroperóxido lipídico (HPL)

A atividade de HPL foi avaliada a partir do isolamento das amostras de tecido cerebral, 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 conforme recomendação do fabricante do kit. A absorbância foi comparada com uma curva padrão de hidroperóxido para determinar a quantidade de peroxidação lipídica nas amostras. A HPL foi quantificada em nmol.

### 3.6.5.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A partir das amostras de tecido cerebral de roedores foi avaliada a formação de TBARS, durante uma reação ácida aquecida, como descrito anteriormente por Esterbauer e Cheeseman (1990). As amostras foram incorporados numa mistura de 0 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,67% e 1 ml de ácido tricloroacético a 10% e em seguida, foi aquecido em banho de água fervente durante 15 min. A absorbância foi lida a 535 nm.

### 3.6.5.3 4-Hidroxinonenal (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 e colegas (2005).

## 3.6.6 *Oxidação e nitração proteica*

### 3.6.6.1 Carbonilação de proteínas

Os grupos carbonilas foram quantificados por meio da reação com dinitrofenil-hidrazina (DNPH) para avaliar o dano oxidativo a proteínas, como descrito previamente por Levine et al. (1994). A absorbância foi lida a 370 nm.

### 3.6.6.2 3-Nitrotirosina (3-Nitro)

A quantificação de 3-Nitro foi realizada usando o kit de ensaio da Biolabs Celular®. A quantidade de 3-Nitro nas amostras foi determinada por comparação com uma curva padrão.

### 3.6.7 *Atividade de enzimas antioxidantes*

#### 3.6.7.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina e mensurada por espectrofotômetro, conforme descrito por Bannister e Calabrese (1987).

#### 3.6.7.2 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada, através por espectrofotômetro, pela análise da taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm (Aebi, 1984).

#### 3.6.7.3 Glutaciona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi medida utilizando o kit de ensaio por Cayman Chemical®. Uma unidade de GPx é definida como a quantidade de enzima que irá causar a oxidação de 1,0 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> por minuto a 25°C.

#### 3.6.7.4 Glutaciona redutase (GR)

A atividade de GR foi medida utilizando o kit de ensaio por Cayman Chemical®. Uma unidade de GR foi determinada pela quantidade de enzima que causou a oxidação de 1,0 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> por minuto a 25°C.

### 3.6.8 *Determinação de proteínas*

Todos os parâmetros bioquímicos foram normalizados para o teor de proteína usando albumina bovina como padrão (Lowry, 1951).

## 3.7 **Análises Estatísticas**

Todos os dados estão apresentados com média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por ANOVA três vias seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Os resultados obtiveram diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

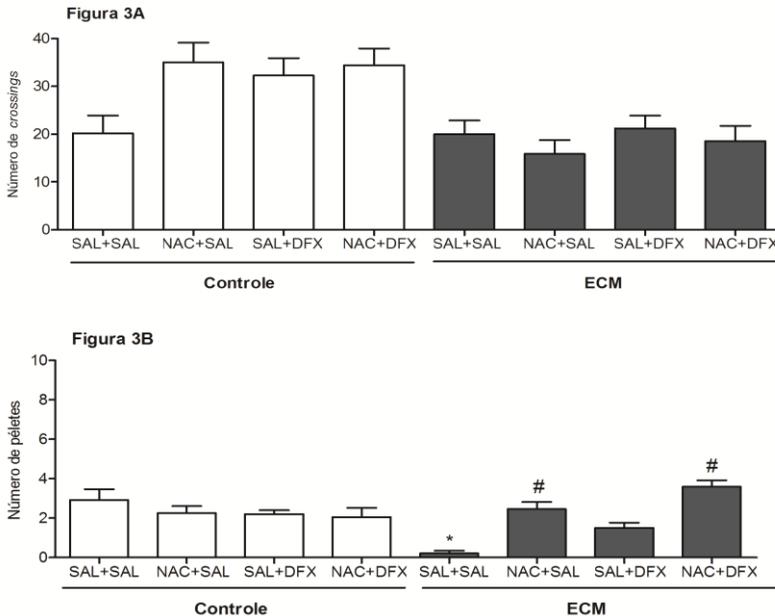
A **figura 3** demonstra os efeitos comportamentais do tratamento com NAC e/ou DFX, em ratos submetidos ao protocolo de ECM. No teste do campo aberto (**Figura 3A**), não foram observadas diferenças no número de *crossings* para nenhum dos grupos avaliados. No teste do consumo de alimento doce (**Figura 3B**), o protocolo de ECM diminuiu a ingestão de doce, quando comparado ao grupo controle. Além disso, os tratamentos com NAC e com a associação de NAC+DFX reverteram essa alteração comportamental. Além disso, o tratamento com NAC e/ou DFX *per se* não alterou o consumo de alimento doce.

A quantificação de superóxido e TBARS em partículas submitocondriais e TBARS em tecido total estão apresentados na **Figura 4**. Não foram observadas diferenças nos níveis de superóxido em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas dos animais submetidos ao ECM. No entanto, a administração de NAC e/ou DFX diminuíram os níveis de superóxido em partículas submitocondriais na amígdala dos ratos submetidos ao protocolo de ECM, quando comparado ao grupo controle. Ainda na amígdala, o tratamento com DFX e NAC+DFX *per se* também diminuíram os níveis de superóxido mitocondrial (**Figura 4A**).

Os níveis de TBARS em partícula submitocondrial não foram alterados nos grupos submetidos ao protocolo de ECM tratados com salina, em todas as estruturas cerebrais avaliadas. O tratamento com DFX *per se* diminuiu os níveis de TBARS em partícula submitocondrial no hipocampo e no córtex frontal e a administração de NAC+DFX *per se* diminuiu esse parâmetro apenas no hipocampo. Nos grupos ECM, a combinação de NAC+DFX diminuiu os níveis de TBARS em partícula submitocondrial no hipocampo e na amígdala, e a administração de DFX diminuiu esse parâmetro no córtex frontal (**Figura 4B**).

Os ratos submetidos ao protocolo de ECM apresentaram os níveis de TBARS aumentado no tecido total de hipocampo e amígdala. A administração NAC preveniu esse aumento em todas as estruturas cerebrais avaliadas. O tratamento com DFX reverteu o aumento de TBARS na amígdala e no hipocampo. Já o tratamento associado de NAC e DFX reverteu o aumento de TBARS apenas na amígdala de ratos submetidos ao protocolo de ECM (**Figura 4C**).

**Figura 3.** Teste do Campo Aberto. Avaliação da atividade locomotora (número de *crossings*) (A) e do número de pélletes de alimento doce (B) após o tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em ratos submetidos ao ECM. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo ECM x SAL.



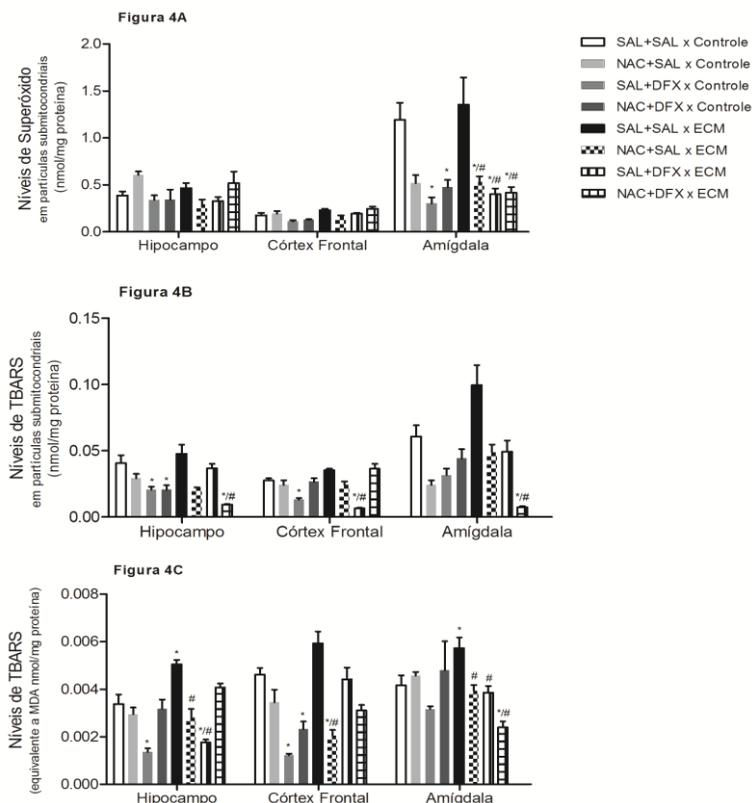
Fonte: do autor.

Na **Figura 5** está apresentado o dano oxidativo à proteína através da avaliação dos níveis de proteínas carboniladas no modelo animal induzido por ECM. O protocolo de ECM aumentou o dano oxidativo a proteínas somente no córtex frontal dos ratos estressados e o tratamento com NAC e/ou DFX reverteu esse dano. A administração de NAC e/ou DFX nos grupos controles e nos grupos ECM diminuíram os níveis de carbonilação de proteínas no hipocampo e na amígdala dos ratos, quando comparados com os grupos Controle+SAL e ECM+SAL.

A **Figura 6** mostra os efeitos do NAC ou DFX sobre a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT, em ratos submetidos ao protocolo de ECM. Como pode ser observado na **Figura 6A** o protocolo de ECM não alterou a atividade da SOD em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas. A administração *per se* de DFX ou a associação de NAC+DFX aumentaram a atividade da SOD no córtex frontal e na

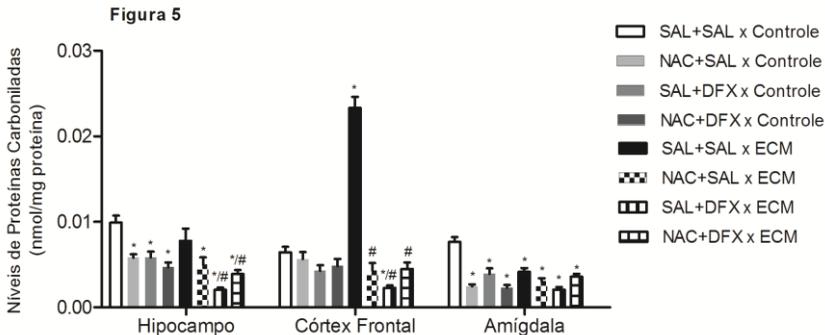
amígdala dos ratos do grupo controle. Além disso, a administração isolada de NAC no grupo ECM aumentou a atividade da SOD apenas no hipocampo. A administração isolada de DFX aumentou os níveis da SOD no hipocampo e córtex frontal dos ratos estressados. Já o tratamento associado de NAC + DFX no grupo ECM aumentou os níveis de SOD em todas as estruturas avaliadas.

**Figura 4.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em Superóxido em partículas submitocondriais (A), Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em partículas submitocondriais (B) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecido total (C) no hipocampo, córtex frontal e amígdala de ratos submetidos ao ECM. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo ECM x SAL.



Fonte: do autor.

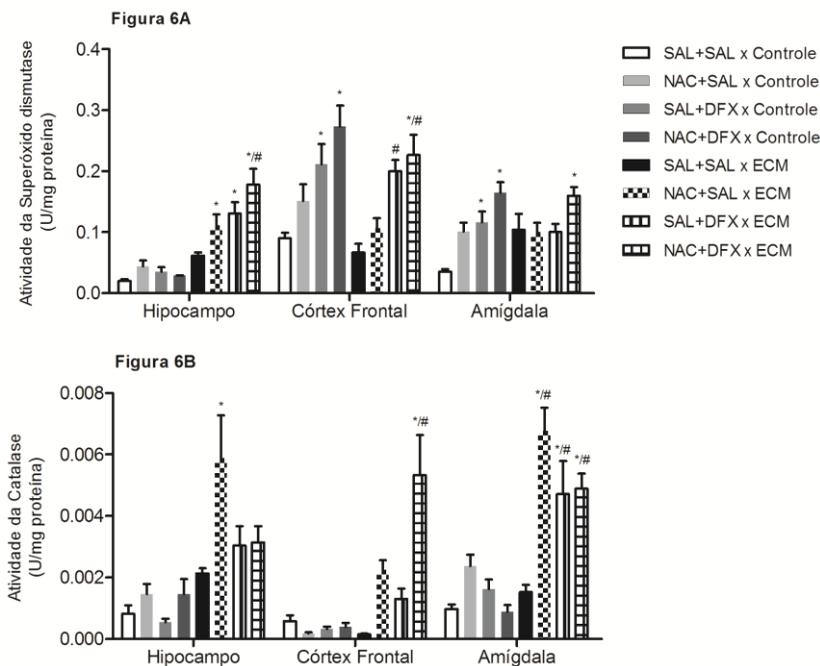
**Figura 5.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em proteínas carboniladas no hipocampo, córtex frontal e amígdala de ratos submetidos ao ECM. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo ECM x SAL.



A exposição ao ECM também não alterou a atividade da CAT, em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas (**Figura 6B**). O tratamento isolado de NAC aumentou a atividade da CAT no hipocampo e amígdala dos animais do grupo ECM. O tratamento com DFX aumentou a atividade da CAT apenas na amígdala dos animais submetidos ao ECM. O tratamento associado de NAC + DFX também aumentou a atividade da CAT no córtex frontal e amígdala dos ratos estressados.

Na **Figura 7**, está representado o desempenho locomotor dos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por PSP em camundongos (número de *crossings*). A administração dos antioxidantes, NAC e/ou DFX *per se* não alterou a atividade locomotora nos animais. No entanto, a PSP induziu aumento a atividade locomotora dos animais, um comportamento considerado do tipo maníaco. Essa alteração comportamental foi prevenida pela administração da associação de NAC e DFX. Por outro lado, a administração isolada destes antioxidantes não alterou o comportamento do tipo maníaco induzido pela PSP.

**Figura 6.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da atividade da catalase (CAT) no hipocampo, córtex frontal e amígdala de ratos submetidos ao ECM. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo ECM x SAL.

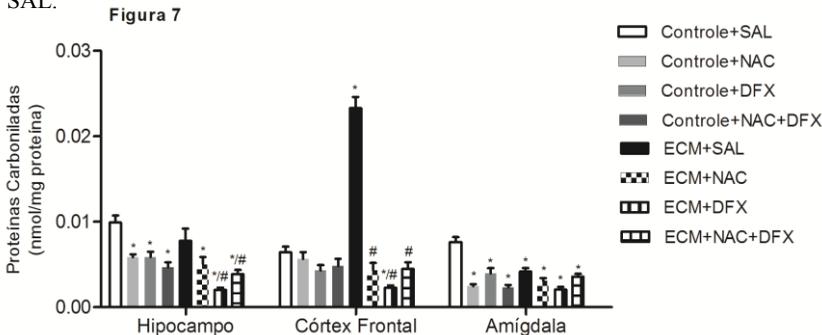


Fonte: do autor.

A administração de NAC *per se* diminuiu os níveis de TBARS no hipocampo e no córtex frontal dos ratos e a combinação de NAC+DFX *per se* diminuíram esses parâmetros apenas no córtex frontal. A **Figura 8** mostra três parâmetros de dano oxidativo à lipídeo no modelo animal de mania induzido pela PSP. Na **Figura 8A**, é evidenciado que os níveis de HPL no hipocampo e córtex frontal de camundongos estão aumentados nos animais submetidos à PSP. A administração combinada de NAC + DFX preveniu o aumento de HPL induzido pela PSP, em ambas as estruturas cerebrais avaliadas. No hipocampo, o tratamento com DFX não impediu o aumento de HPL induzido pela PSP e administração NAC aumentou ainda mais os níveis

de HPL no grupo PSP. No córtex frontal, a administração isolada de NAC ou DFX não alterou o aumento do HPL induzido pela PSP.

**Figura 7.** Teste de campo aberto. Avaliação da atividade locomotora (número de *crossings*) após o tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em camundongos submetidos à PSP. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo PSP x SAL.

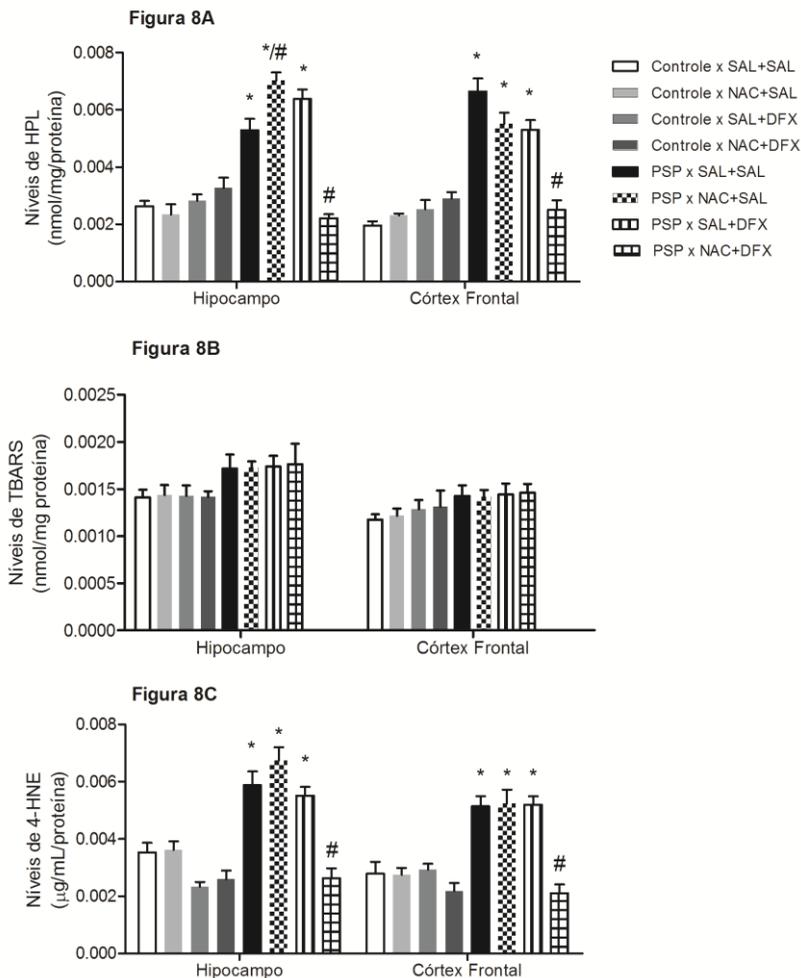


Os níveis de TBARS no hipocampo e no córtex frontal de camundongos estão apresentados na **Figura 8B**. No entanto, não houve alterações nos níveis de TBARS nessas estruturas e em nenhum dos grupos experimentais.

Os camundongos submetidos ao protocolo de PSP também apresentaram um aumento dos níveis de 4-HNE no hipocampo e no córtex frontal (**Figura 8C**). A administração associada de NAC e DFX preveniu o aumento dos níveis de 4-HNE induzido pela PSP, em ambas as estruturas cerebrais avaliadas. A administração isolada dos antioxidantes NAC ou DFX não foram capazes de proteger o cérebro contra o aumento nos níveis de 4-HNE induzidos pela PSP em camundongos.

A **Figura 9A** mostra os níveis de proteínas carboniladas no hipocampo e no córtex frontal de camundongos. A PSP levou ao aumento dos níveis de grupamentos carbonila no hipocampo de camundongos e o tratamento com NAC e/ou DFX não foram capazes de reverter esta alteração. Além disso, a associação de NAC+DFX aumentou os níveis de grupamentos carbonila no córtex frontal dos camundongos submetidos à PSP.

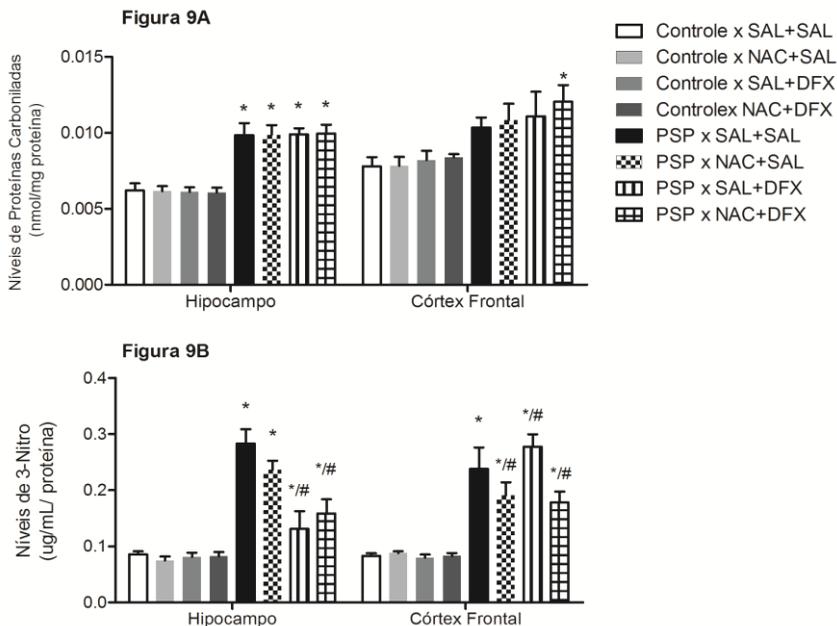
**Figura 8.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em hidroperóxido lipídico (HPL) (A), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) (C) no hipocampo e córtex frontal de camundongos submetidos à PSP. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo PSP x SAL.



Fonte: do autor.

A **Figura 9B** mostra os níveis de 3-Nitro, que também é considerado um indicador ou marcador de danos à proteína. A PSP aumentou os níveis de 3-Nitro no hipocampo e no córtex frontal de camundongos submetidos à PSP. A administração associada de NAC + DFX preveniu parcialmente o aumento dos níveis de 3-Nitro induzido pela PSP, em ambas as estruturas cerebrais avaliadas. No hipocampo, a administração isolada de DFX, mas não NAC, preveniu parcialmente o aumento da 3-Nitro induzida pela PSP. No córtex frontal, a administração de NAC parcialmente preveniu e administração DFX potencializou o aumento da 3-nitro induzida pela PSP em camundongos.

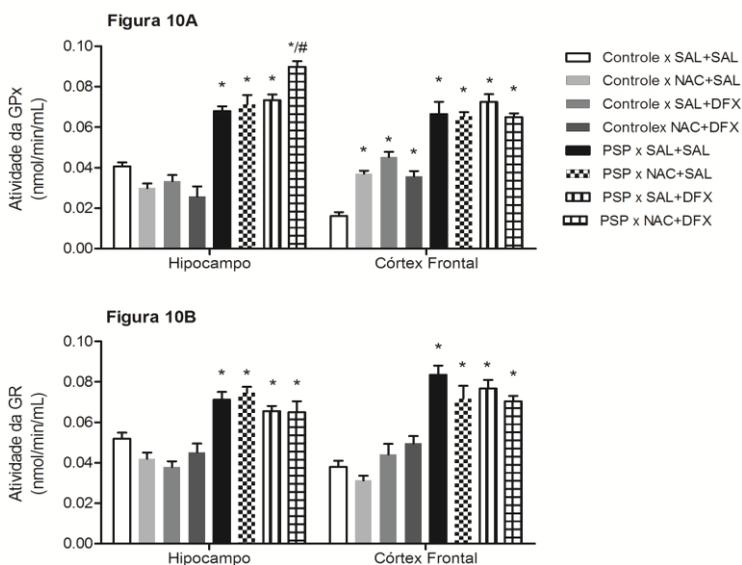
**Figura 9.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX em proteínas carboniladas (A) e 3-nitrotirosina (3-nitro) (B) no hipocampo e córtex frontal de camundongos submetidos à PSP. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste pos-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo PSP x SAL.



Fonte: do autor.

As atividades de GPx e GR no hipocampo e no córtex frontal de camundongos submetidos à PSP são demonstradas na **Figura 10**. A PSP aumentou a atividade da GPx no hipocampo e no córtex frontal dos camundongos submetidos ao protocolo de PSP. Os tratamentos isolados de NAC ou DFX não foram capazes de proteger o cérebro contra esta alteração enzimática, em ambas as estruturas cerebrais avaliadas. Além disso, o tratamento associado de NAC + DFX potencializou o aumento da atividade da GPx induzido pela PSP no hipocampo, mas não no córtex frontal. Nesta última estrutura, a administração de NAC e/ou DFX nos grupos controle aumentou a atividade da GPx (**Figura 10A**).

**Figura 10.** Efeitos do tratamento com NAC, DFX ou NAC + DFX sobre a atividade da glutatona peroxidases (GPx) (A) e sobre a atividade da glutatona redutase (GR) (B) no hipocampo e córtex frontal de camundongos submetidos à PSP. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de três vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Controle x SAL). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo PSP x SAL.



Fonte: do autor.

O protocolo de PSP também aumentou a atividade de GR no hipocampo e no córtex frontal de camundongos, além de que todos os tratamentos com antioxidantes não foram capazes de prevenir esta alteração enzimática (**Figura 10B**).

## 5 DISCUSSÃO

Modelos animais de transtornos psiquiátricos, como o TDM e o TB, são ferramentas de extrema importância para avaliar a neurobiologia e encontrar novos alvos para o tratamento destes transtornos. Assim, um modelo animal de transtorno psiquiátrico deve apresentar três características principais: I) habilidade do modelo em mimetizar sintomas do determinado transtorno (validade de face); II) habilidade do modelo em mimetizar características fisiopatológicas do transtorno (validade de constructo) e III) os sintomas induzidos no modelo devem ser revertidos e/ou prevenidos por fármacos clássicos, usados na clínica médica para o tratamento do determinado transtorno (validade preditiva) (Machado-Vieira et al., 2004). Então, além da avaliação comportamental, este estudo avaliou parâmetros de estresse oxidativo e a eficácia do tratamento com os antioxidantes NAC e ou DFX nos modelos animais de depressão e mania.

Os resultados comportamentais deste estudo mostram que o protocolo de ECM induziu anedonia em ratos, que é um comportamento tipo depressivo caracterizado pela diminuição da ingestão de alimento doce. Estes dados corroboram com estudos anteriores, que também observaram anedonia em ratos submetidos ao mesmo protocolo de ECM (Garcia et al., 2009; Fortunato et al., 2010; Réus et al., 2012). Os tratamentos com NAC e NAC+DFX foram capazes de reverter essa diminuição do consumo de alimento doce, sugerindo um efeito antidepressivo desses tratamentos antioxidantes.

A anedonia é um sintoma clínico de depressão, assim, sugere-se que a administração isolada de NAC ou em associação à DFX exerceu efeito antidepressivo. Estudos básicos e clínicos também demonstram propriedades antidepressivas do NAC. O estudo de Ferreira et al. (2008) mostrou que a NAC em diferentes doses (15, 50 e 150 mg/kg) causou efeitos antidepressivos em ratos submetidos ao teste da natação forçada. Além disso, Magalhães et al. (2011) realizaram uma pesquisa clínica, controlada com placebo, para avaliar os efeitos do tratamento adjuvante de NAC para o TB.

O protocolo de PSP induziu hiperlocomoção em camundongos, que é considerado um comportamento do tipo maniaco (Decker et al., 2000). Estudos anteriores também demonstraram que a PSP induz hiperatividade, a qual é revertida pelo tratamento com lítio (Gessa et al., 1995; Benedetti et al., 2008; Armani et al., 2012). Juntos com os resultados deste estudo, esses dados mostram que a PSP é um bom

modelo animal para estudar novos alvos terapêuticos para o TB. Além disso, a PSP pode ser considerada também uma importante ferramenta para a compreensão da etiologia deste transtorno, pois as alterações do ciclo circadiano são observadas em pacientes bipolares, principalmente durante os episódios maníacos (Berns e Nemeroff, 2003). O tratamento associado de NAC e DFX foi capaz de prevenir a hiperlocomoção induzida pela PSP. Um estudo prévio demonstrou que NAC preveniu a hiperlocomoção induzida por meta-anfetamina em ratos, sugerindo também que o NAC pode ter propriedades antimaníacas (Fukami et al., 2004). Além disso, dois diferentes estudos de um mesmo grupo investigaram a eficácia da NAC no tratamento para o TB. Estes estudos demonstraram que o tratamento adjunto com NAC foi efetivo no tratamento de episódios depressivos em pacientes bipolares (Magalhães et al., 2011) e também em episódios de mania e hipomania (Magalhães et al., 2013). Juntos, os dados aqui apresentados e estudos prévios sugerem que a administração de NAC e DFX pode ser considerada uma nova possibilidade para o tratamento adjuvante do TB, pois a combinação desses fármacos age tanto em comportamentos tipo maníaco quanto em comportamentos do tipo depressivo.

Além disso, os resultados do presente estudo demonstraram que tanto no protocolo de ECM quanto no de PSP ou o tratamento com os antioxidantes não alteraram a atividade locomotora nos grupos controles. Estes resultados sugerem que os efeitos da NAC e/ou DFX sobre o comportamento do tipo depressivo e sobre o comportamento tipo maníaco não foram justificados pela hiperatividade ou sedação, respectivamente.

Está bem descrito na literatura que a NAC modula algumas vias de neurotransmissores, incluindo o glutamato e a dopamina (Dean et al., 2011). A NAC é convertida em cisteína, que está envolvida no antiporte do glutamato, que ocorre principalmente em células gliais e é uma das formas de regulação extracelular desse neurotransmissor (Baker et al., 2002; Lafleur et al., 2006). Além disso, o glutamato combinado com glicina e cisteína são necessários para a produção de

glutathione, o que também acaba regulando diretamente a quantidade de glutamato presentes no espaço extracelular (Ogita et al., 1986; Varga et al., 1997). A respeito do DFX, alguns estudos mostraram seu efeito neuroprotetor contra danos neuronais dopaminérgicos (Zhang et al., 2005; Valvassori et al., 2008). Zhang et al. (2005) demonstraram que a administração de DFX na substância *nigra* tem efeitos protetores contra a morte neuronal dopaminérgica induzida por lactacistina.

Além disso, estudos prévios demonstraram que uma hipótese para a causa da depressão é a deficiência funcional de monoaminas, como a dopamina. Os sistemas mesolímbicos e mesocorticais dopaminérgicos estão envolvidos com a anedonia, podendo este sintoma ser revertido por um antagonista do receptor de dopamina D<sub>2</sub>, o haloperidol. (Gold et al., 1988; Muscat et al., 1992). Assim, o protocolo de ECM, que causou sintoma anedônico e foi revertido pelo tratamento associado de NAC e DFX, parece ter um envolvimento monoaminérgico com a depressão. No entanto, o sistema glutamatérgico também tem sido apontado como um importante alvo para a fisiopatologia e tratamento do TDM, sendo evidenciado aumento dos níveis de glutamato no soro de pacientes depressivos (Mitani et al., 2006). Neste sentido, foi observado em diversos estudos que antagonistas de D-aspartato-metil-N (NMDA) apresentam propriedades antidepressivas (Garcia et al., 2009; Réus et al., 2010; 2011; 2012). É bem conhecido que o excesso de glutamato leva ao aumento do influxo de cálcio celular, este aumento das concentrações de cálcio intracelular pode levar ao aumento de EROs e à ativação das vias de sinalização de apoptose (Dawson et al., 1994).

Além disso, há a evidência de que a PSP leva ao aumento de receptores D<sub>1</sub> nas áreas límbicas (Spanegel et al., 1992), aumento dos níveis de dopamina nigrostriatal, o qual foi prevenido com o bloqueio de receptores D<sub>2</sub> pelo haloperidol (Proença et al., 2014). Uma meta-análise recente revelou que os níveis de glutamato, medidos por espectroscopia de ressonância magnética, são elevados em cérebro em pacientes com TB (Gigante et al., 2012). Portanto, pode-se sugerir que, talvez, os efeitos antioxidantes, antidepressivos e antimaníacos da administração associada com NAC e DFX contra o estresse induzido pelo ECM e a hiperatividade induzida pela PSP observados neste estudo, podem estar relacionados aos seus efeitos sobre o sistema dopaminérgico e glutamatérgico.

Este estudo também mostrou que ratos expostos ao protocolo ECM apresentaram um aumento nos níveis de superóxido no córtex frontal e nos níveis TBARS em partículas mitocondriais do córtex frontal e amígdala. Além disso, um aumento dos níveis de TBARS em tecido total no hipocampo e amígdala e um aumento dos níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal também foram observados nos ratos submetidos ao protocolo de ECM. Juntos estes dados indicam que o estresse induzido pelo ECM causou dano oxidativo no cérebro de ratos. É importante notar que a mitocôndria é um grande produtor de

EROs, além de que durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial gera superóxido, que por sua vez provoca danos à lipídios e proteínas (Giacco e Brownlee, 2010). Isto pode explicar o aumento de TBARS e formação de grupamentos carbonila no cérebro de ratos. De fato, o cérebro é vulnerável ao estresse oxidativo devido à elevada taxa de consumo de oxigênio e número limitado de defesas antioxidantes neste tecido (Blici et al., 2001; Valko et al., 2007). Outro estudo pré-clínico observou uma inibição da cadeia respiratória mitocondrial no cérebro em animais expostos ao protocolo de ECM (Rezin et al., 2009), assim, estas alterações no metabolismo energético podem explicar o dano oxidativo. Nesta mesma linha, Barbosa e colaboradores (2010) relataram que o tratamento associado de NAC e DFX foi capaz de prevenir a inibição da cadeia respiratória mitocondrial no cérebro de ratos isquêmicos.

Vários estudos têm mostrado que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da depressão. De fato, o dano oxidativo à lipídio, à ácido graxo e ao DNA são relatados no TDM (Forlenza e Miller, 2006; Dimopoulos et al., 2008; Maes et al., 1999). Além disso, o dano para os ácidos graxos de membrana pode causar alterações na estrutura da membrana celular, o que pode levar às alterações na expressão dos receptores e proteínas funcionais (Maes et al., 1999). Esses receptores podem estar relacionados tanto com a fisiopatologia quanto com o tratamento do TDM. Ainda, alterações destas proteínas podem causar aberrações na transdução de sinal celular, diferenciação celular e processos neuroprogressivos (Maes et al., 2011b), que podem, conseqüentemente, contribuir para o TDM. Estudos anteriores demonstraram que ratos expostos ao protocolo ECM apresentaram aumento nos níveis de superóxido e de TBARS em PSM (Lucca et al., 2009a) e de proteína carbonilada (Lucca et al., 2009b) em tecido cerebral. Estudos clínicos demonstraram que pacientes com TDM possuem níveis plasmáticos de peróxido aumentados (Maes et al., 2010). No presente estudo foi observado também um aumento de dano oxidativo à proteína no cérebro de camundongos submetidos à PSP. Até o momento, este é o primeiro estudo que avaliou os níveis de grupamentos carbonila e 3-Nitro no cérebro de roedores submetidos à PSP. No entanto, estudos usando outros modelos animais de mania têm demonstrado o aumento de dano oxidativo a proteínas no cérebro de ratos (Jornada et al., 2011; Valvassori et al., 2008). Valvassori e colegas (2008) demonstraram que o comportamento tipo maniaco induzido por dextro-anfetamina em ratos foi acompanhado pelo aumento de grupamentos de proteínas carboniladas no córtex frontal e hipocampo

de ratos. Do mesmo modo, verificou-se um aumento de dano oxidativo a proteínas no hipocampo e no córtex frontal de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por ouabaína (Jornada et al., 2011). É importante enfatizar que, no presente estudo, não houve aumento de proteínas carboniladas no córtex frontal de camundongos submetidos à PSP, quando comparado com o grupo controle. Os estudos clínicos sobre o dano oxidativo a proteínas que quantifiquem os níveis de grupos de proteínas carboniladas em pacientes bipolares são controversos, alguns não apresentando diferenças significativas e outros mostrando um aumento nos níveis dos grupamentos carbonilas (Andreazza et al., 2009; Magalhães et al., 2012; Andreazza et al., 2013). Um estudo prévio demonstrou que pacientes com TB apresentaram níveis elevados de proteínas carboniladas no soro, quando comparados com indivíduos saudáveis (Magalhães et al., 2012). No entanto, Andreazza e colaboradores (2009) não encontraram diferenças significativas nos níveis de grupos carbonilas no sangue de pacientes bipolares, quando comparado com o grupo controle. Em outro estudo clínico, este mesmo grupo de pesquisa mostrou que a carbonilação de proteínas esteve aumentada em sinaptossomas do córtex pré-frontal de pacientes bipolares (Andreazza et al., 2009). Além disso, pacientes com TB apresentam níveis elevados de 3-Nitro tanto em fases precoces quanto em fases mais tardias do transtorno (Andreazza et al., 2009).

As atividades das enzimas antioxidantes também foram avaliadas nos modelos animais de transtornos do humor. Os resultados demonstraram que a atividade da SOD estava aumentada no hipocampo e na amígdala de ratos estressados tratados com SAL, isto pode estar relacionado com um mecanismo de compensação, devido ao aumento no estresse oxidativo. É mostrado ainda que, a atividade da CAT permaneceu inalterada em ratos submetidos ao protocolo de ECM. Similar a estes dados, Sahin e Gumuslu (2004) relataram que a GPx esteve aumentada no cérebro de ratos após a exposição ao estresse crônico de frio e imobilização. No entanto, outros estudos têm mostrado uma diminuição de glutatona, GPx, além da redução de vitamina E e zinco no soro de pacientes com depressão (Gawryluk et al., 2011; Maes et al., 2011a; Ozcan et al., 2004). Lucca et al. (2009b) mostraram um aumento na atividade de CAT no cerebelo, hipocampo, estriado e córtex, além da diminuição da atividade da SOD no cérebro de ratos estressados, sugerindo que o desequilíbrio entre estas enzimas podendo ser relacionado com o TDM. A discrepância neste estudo pode estar relacionada, pelo menos em parte, com a área do cérebro analisado e

diferenças no protocolo experimental utilizado. A SOD é uma enzima antioxidante importante capaz de detoxificar o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) da célula, catalisando a dismutação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Fridovich, 1983). A CAT é outra enzima antioxidante que apresenta uma função muito semelhante ao da GPx, complementando a atividade da outra (Butterfield et al., 2002; Calabrese et al., 2002), e ambos convertem  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ . A CAT tem uma atividade baixa no cérebro, mas tornou-se importante na remoção de  $H_2O_2$  em relação a GPx, principalmente quando existe uma elevada concentração de  $H_2O_2$ , uma vez que a  $K_m$  (concentração de substrato necessária para que a reação atinja a metade da velocidade máxima) de CAT para  $H_2O_2$  é muito mais elevada do que a GPx (Halliwell e Gutteridge, 1999). Estudos anteriores relataram que tratamentos antidepressivos apresentam uma ação antioxidante. Por exemplo, foi demonstrado recentemente que a imipramina, um antidepressivo, e  $\beta$ -carbolina harmina, que também apresentam propriedades antidepressivas, reduziu o dano oxidativo e aumentou a atividade da SOD e da CAT no cérebro de ratos (Réus et al., 2010b). O pré- e pós-tratamento com o antidepressivo escitalopram foi capaz proteger contra as lesões neuronais isquêmicas experimentais através da regulação da expressão de BDNF e do estresse oxidativo (Lee et al., 2011). Além disso, o tratamento de longo prazo com o antidepressivo venlafaxina protegeu contra o dano oxidativo celular e ao DNA induzido por estresse (Abdel-Wahab e Salama, 2011), sugerindo que a modulação farmacológica do dano oxidativo ao DNA induzido por estresse é um alvo importante para o tratamento da depressão.

Este estudo mostra que o tratamento com NAC e DFX foi capaz de reduzir o dano oxidativo em partículas submitocondriais e em tecido cerebral de ratos estressados. Além disso, a atividade da SOD e da CAT ficou aumentada após o tratamento com NAC e DFX, no entanto, a administração associada de NAC e DFX teve um efeito mais expressivo do que com os tratamentos isolados. Estes resultados corroboram com outros estudos que mostram propriedades antioxidantes do NAC e DFX. De fato, Aguiar et al. (2008) demonstraram que a suplementação de NAC e DFX teve efeito protetor contra danos oxidativos no cérebro de ratos, após exercício intenso. Além disso, o tratamento com NAC+DFX foi capaz de reverter e prevenir o dano oxidativo causado pela d-anfetamina (Valvassori et al., 2008). O aumento de TBARS, carbonilação de proteínas e produção de superóxido mitocondrial foi associado ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, onde a NAC e a DFX também exerceram efeitos anti-inflamatórios (de Souza

et al., 2007). Assim, estes resultados podem ser atribuídos, pelo menos em parte, para as propriedades anti-inflamatórias de NAC e DFX. Recentemente, estudos têm considerado o TDM uma síndrome inflamatória (Malhi e Berk, 2007; Maes et al., 2012).

No presente estudo, usando o modelo animal de mania induzido por PSP, foi avaliada as atividades da GPx e GR, que se mostraram aumentadas no cérebro dos camundongos privados de sono por 36 horas. Confirmando esse resultado, Vollert e colegas (2011) demonstraram que a atividade de GR foi aumentada no hipocampo, córtex e amígdala de ratos submetidos à PSP. Entretanto, diferentemente desses resultados, um estudo anterior demonstrou que a PSP reduziu a atividade da GPx no hipocampo de ratos *Wistar* (Alzoubi et al., 2012). Esta discrepância pode ser explicada, pelo menos em

parte, pela diferença no protocolo experimental e pela diferença das espécies de roedores utilizadas. Usando outro modelo animal de mania, um estudo anterior mostrou que o comportamento do tipo maníaco foi acompanhado pelas atividades aumentadas da GR e GPx após a administração ouabaína em ratos (Valvassori et al., 2014). Além disso, vários estudos clínicos têm demonstrado alterações nas atividades das enzimas antioxidantes em pacientes com TB (Machado-Vieira et al., 2007; Andreatza et al., 2009; Gawryluk et al., 2011). Em amostras de soro de pacientes com TB a atividade da GR foi aumentada, em fases precoce e tardia deste transtorno (Andreatza et al., 2009). Em conjunto, essas evidências indicam o envolvimento da GPx e GR na fisiopatologia do TB.

A estrutura molecular da NAC permite que esta substância atravesse facilmente as membranas celulares. Uma vez dentro da célula, acetilcisteína é desacetilada, formando L-cisteína, o que é essencial para a síntese de glutathione (Rushworth e Megson, 2014).

É importante ressaltar que, neste estudo, a PSP aumentou a atividade das enzimas GPx e GR e que NAC não alterou esta disfunção enzimática. Apesar de os níveis de glutathione total não terem sido avaliados, pode-se sugerir que os danos oxidativos induzidos pela PSP aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR.

Por outro lado, como descrito anteriormente, NAC pode regular os níveis extracelulares de glutamato, através de dois mecanismos principais: 1) antiporte glutamato/cisteína e 2) a produção de glutathione (Baker et al., 2002; Lafleur et al., 2006). Considerando que o excesso de glutamato extracelular pode levar ao estresse oxidativo e toxicidade neuronal (Greenamyre, 1986; Dawson et al., 1994; Myint 2013); pode-

se sugerir que, um dos mecanismos de proteção da NAC pode ser através da regulação dos níveis de glutamato. No entanto, é importante enfatizar que o efeito protetor observado no presente estudo, contra comportamento tipo maníaco e contra o dano oxidativo, foi com o tratamento adjunto da NAC com a DFX.

DFX é um quelante hexadentado com uma alta afinidade e seletividade pelo ferro, uma molécula de DFX se liga a um átomo de ferro, formando um complexo estável (Kushner et al., 2001). O ferro é um metal essencial para a maioria dos organismos. No entanto, o excesso de ferro causa estresse oxidativo através da produção de radicais hidroxilas altamente tóxicos através da reação de Fenton/Haber-Weiss. Os efeitos neuroprotetores de DFX têm sido relacionados com a sua capacidade de inibir essas reações de radicais livres dependentes de ferro (Halliwell, 1987, 1989; Valvassori et al., 2008). No presente estudo, os efeitos protetores da NAC combinados com os de DFX foram capazes de proteger contra o comportamento tipo maníaco e contra o dano oxidativo no cérebro de camundongos submetidos à PSP.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados apresentados mostram que o modelo animal de depressão induzida por ECM foi capaz de mimetizar o comportamento tipo depressivo e também alterações bioquímicas, semelhantes às aquelas observadas em pacientes depressivos. O tratamento associado de NAC e DFX foi capaz de reverter a anedonia induzida pelo ECM, bem como o dano oxidativo.

Da mesma forma, o modelo animal de mania induzido por PSP também mimetizou o comportamento do tipo maníaco e alterações bioquímicas associadas ao TB. O tratamento combinado de NAC com DFX foi capaz de reverter a hiperlocomoção e contra o dano oxidativo induzidos pelo PSP.

Em conjunto, estes resultados indicam que o estresse oxidativo e os mecanismos antioxidantes são importantes para ajudar no entendimento da fisiopatologia e para o desenvolvimento de novos tratamentos para os transtornos do humor. No entanto, mais estudos clínicos e pré-clínicos são necessários para que se possa sugerir este tratamento adjuvante para a terapêutica dos transtornos do humor.

## REFERÊNCIAS

Aas M, Steen NE, Agartz I, Aminoff SR, Lorentzen S, Sundet K, Andreassen OA, Melle I. Is cognitive impairment following early life stress in severe mental disorders based on specific or general cognitive functioning? *Psychiatry Res.* 2012; 198(3):495-500.

Abdel-Wahab BA, Salama RH. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011; 100(1): 59-65.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121–6.

Aguiar AS Jr, Tuon T, Soares FS, da Rocha LG, Silveira PC, Pinho RA. The effect of n-acetylcysteine and deferoxamine on exercise-induced oxidative damage in striatum and hippocampus of mice. *Neurochem Res.* 2008; 33(5): 729-36.

Alzoubi KH, Khabour OF, Rashid BA, Damaj IM, Salah HA. The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: the role of oxidative stress. *Behav Brain Res.* 2012; 226(1): 205-10.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5.* 5. ed Washington, D.C.: American Psychiatric Publishing. 2013; 847 p.

Anderson IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a attenuates the effects of antidepressants on the forced swim test in rats. *Brain Res.* 1996; 709(2): 215-20.

Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, Young LT, Yatham LN. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2009; 34(4): 263-71.

Andreazza AC, Wang JF, Salmasi F, Shao L, Young LT. Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder. *J Neurochem.* 2013; 127(4): 552-61.

Andriantsitohaina R, Duluc L, Garcia-Rodriguez JC, Gil-del Valle L, Guevara-Garcia M, Simard G, Soleti R, Su DF, Velásquez-Pérez L, Wilson JX, Laher I. Systems biology of antioxidants. *Clin Sci*. 2012; 123(3): 173-92.

Angst J. Bipolar disorders in DSM-5: strengths, problems and perspectives. *Int J Bipolar Disord*. 2013; 1:12.

Armani F, Andersen ML, Andreatini R, Frussa-Filho R, Tufik S, Galduróz JC. Successful combined therapy with tamoxifen and lithium in a paradoxical sleep deprivation-induced mania model. *CNS Neurosci Ther*. 2012; 18(2):119-25.

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6): 593-7.

Baek JH, Park DY, Choi J, Kim JS, Choi JS, Ha K, Kwon JS, Lee D, Hong KS. Differences between bipolar I and bipolar II disorders in clinical features, comorbidity, and family history. *J Affect Disord*. 2011; 131(1-3):59-67.

Baker DA, Shen H, Kalivas PW. Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. *Amino Acids*. 2002; 23(1-3): 161-2.

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

Barbosa PR, Cardoso MR, Daufenbach JF, Gonçalves CL, Machado RA, Roza CA, Scaini G, Rezin GT, Schuck PF, Dal-Pizzol F, Streck EL. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after renal ischemia is prevented by N-acetylcysteine and deferoxamine. *Metab Brain Dis*. 2010; 25(2): 219-25.

Belmaker RH. Bipolar disorder. *N Engl J Med*. 2004; 351(5):476-86.

Benedetti F, Fresi F, Maccioni P, Smeraldi E. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. *Behav Brain Res*. 2008; 187(2): 221-7.

Berg D, Youdim MB, Riederer P. Redox imbalance. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1), 201-13.

Berk M, Copolov DL, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaizt I, Anderson-Hunt M, Bush AI. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder--a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry.* 2008; 64(6): 468-75.

Berk M, Dean O, Cotton SM, Gama CS, Kapczinski F, Fernandes BS, Kohlmann K, Jeavons S, Hewitt K, Allwang C, Cobb H, Bush AI, Schapkaizt I, Dodd S, Malhi GS. The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. *J Affect Disord.* 2011; 135(1-3):389-94.

Berns GS, Nemeroff CB. The neurobiology of bipolar disorder. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003; 123C(1): 76-84.

Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(2): 137-51.

Birden E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1):9-19.

Blici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord.* 2001; 64(1): 43-51.

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 429-35.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972; 128(3): 617-27.

Bowden CL, Calabrese JR, McElroy SL, Gyulai L, Wassef A, Petty F, Pope HG Jr, Chou JC, Keck PE Jr, Rhodes LJ, Swann AC, Hirschfeld RM, Wozniak PJ. A randomized, placebo-controlled 12-month trial of divalproex and lithium in treatment of outpatients with bipolar I disorder. Divalproex Maintenance Study Group. *Arch Gen Psychiatry.* 2000; 57(5):481-9.

Brisch R, Bernstein HG, Dobrowolny H, Krell D, Stauch R, Trübner K, Steiner J, Ghabriel MN, Bielau H, Wolf R, Winter J, Kropf S, Gos T, Bogerts B. A morphometric analysis of the septal nuclei in schizophrenia and affective disorders: reduced neuronal density in the lateral septal nucleus in bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2011; 261(1): 47-58.

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

Brus MJ, Solanto MV, Goldberg JF. Adult ADHD vs. Bipolar Disorder in the DSM-5 Era: A Challenging Differentiation for Clinicians. *J Psychiatr Pract*. 2014; 20(6):428-37.

Budni J, Valvassori SS, Quevedo J. Biological mechanisms underlying neuroprogression in bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; 35(1):1-2.

Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*. 2002; 13(8):444.

Calabrese V, Scapagnini G, Latteri S, Colombrita C, Ravagna A, Catalano C, Pennisi G, Calvani M, Butterfield DA. Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in different brain regions in the rat: protection by acetyl carnitine. *Int. J. Tissue React*. 2002; 24(5): 97-104.

Casarotto PC, Andreatini R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007; 17(11):735-42.

Clark L, Iversen SD, Goodwin GM. Sustained attention deficit in bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2002; 180: 313-9.

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

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. *Ann NY Acad Sci*. 1994; 738: 76-85.

De Flora S, Izzotti A, D'Agostin F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med.* 1991; 91(3C): 122S–30S.

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

de Souza LF, Ritter C, Pens Gelain D, Andrades M, Bernard EA, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Mitochondrial superoxide production is related to the control of cytokine release from peritoneal macrophage after antioxidant treatment in septic rats. *J Surg Res.* 2007; 141(2): 252-6.

Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.* 2011; 36(2): 78-86.

Decker S, Grider G, Cobb M, Li XP, Huff MO, El-Mallakh RS, Levy RS. Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced hyperlocomotion in the development of an animal model for bipolar illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2000; 24(3): 455-62.

Dimopoulos N, Piperi C, Psarra V, Lea RW, Kalofoutis A. Increased plasma levels of 8-iso-PGF<sub>2</sub>α and IL-6 in an elderly population with depression. *Psychiatry Res.* 2008; 161(1): 59-66.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):47-95.

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in post-mortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry.* 2003; 60(8): 804-15

Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 1990; 1(6): 469-90.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-21.

Everson CA, Smith CB and Sokoloff L. Effects of prolonged sleep deprivation on local rates of cerebral energy metabolism in freely moving rats. *J Neurosci*. 1994; 14 (11 Pt 2):6769-78.

Ferreira FR, Biojone C, Joça SR, Guimarães FS. Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. *Behav Pharmacol*. 2008; 19(7): 747-50.

Ferrier IN, Stanton BR, Kelly TP, Scott J. Neuropsychological function in euthymic patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 1999; 175: 246-51.

Forlenza MJ, Miller GE. Increased serum levels of 8-hydroxy- 20-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med*. 2006; 68(1): 1-7.

Fortunato JJ, Réus GZ, Kirsch RTR, Stringari RB, Fries GR, Kapczinski F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J. Effects of beta-carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: Further evidence of antidepressant properties. *Brain Res Bull*. 2010; 81(4-5): 491-96.

Frey BN, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disord*. 2006; 8(3): 275-80.

Fridovich I. Superoxide dismutases: regularities and irregularities. *Harvey Lect*. 1983; 79:51-75.

Fukami G, Hashimoto K, Koike K, Okamura N, Shimizu E, Iyo M. Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Res*. 2004; 1016(1): 90-5.

Gałecki P, Szemraj J, Bienkiewicz M, Zboralski K, Gałecka E. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. *Hum Psychopharmacol*. 2009a; 24(4): 277-286.

Gałecki P, Szemraj J, Bienkiewicz M, Florkowski A, Gałecka E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep*. 2009b; 61(3): 436-47.

Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects stress on feeding behavior and on monoamine levels in structures. *Neurochem Int.* 2003; 42(2): 107-14.

Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo J. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33(3): 450-5.

Gawryluk JW, Wang JF, Andreatza AC, Shao L, Young LT. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011; 14(1): 123-30.

Gessa GL, Pani L, Fadda P, Fratta W. Sleep deprivation in the rat: An animal model of mania. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1995; 5 Suppl: 89-93.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010; 107(9): 1058-70.

Gigante AD, Bond DJ, Lafer B, Lam RW, Young LT, Yatham LN. Brain glutamate levels measured by magnetic resonance spectroscopy in patients with bipolar disorder: a meta-analysis. *Bipolar Disord.* 2012; 14(5): 478-87.

Gitlin M. Treatment-resistant bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 2006; 11(3): 227-40.

Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. *N Engl J Med.* 1988; 319(6): 348-53.

Goodwin GM. Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder: revised second edition - recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol.* 2009; 23(4): 346-88.

Greenamyre JT. The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch Neurol.* 1986; 43(10): 1058-63.

Greenhouse WJ, Meyer B, Johnson SL. Coping and Medication Adherence in Bipolar Disorder. *J Affect Disord.* 2000; 59(3):237-41.

Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(10): 2175-83.

Haddad PM, Das A, Ashfaq M, Wieck A. A review of valproate in psychiatric practice. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009; 5(5):539-51.

Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc.* 1987; 46(1): 13-26.

Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989; 82(12): 747-52.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3rd ed. New York: Oxford University Press. 1999.

Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci.* 2006, 31(9): 509-15.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35(Pt 5): 1147-50.

Harris EC, Barraclough B. Excess mortality of mental disorder. *Br J Psychiatry.* 1998; 173:11-53.

Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2007; 62(11): 1310-6.

Hiroeh U, Appleby L, Mortensen PB, Dunn G. Death by homicide, suicide, and other unnatural causes in people with mental illness: a population-based study. *Lancet.* 2001; 358(9299): 2110-2.

Holtzheimer PE, Nemeroff CB. Advances in the treatment of depression. *NeuroRx.* 2006; 3(1): 42-56.

Jorge, MR. (Coord.). *DSM-IV-TR: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais.* 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 880 p.

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.

Juli A, Juli L. New antidepressant drugs for new depressions. *Psychiatr Danub.* 2014; 26 Suppl 1: 115-6.

Kaplan KA, Harvey AG. Behavioral treatment of insomnia in bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 2013; 170(7): 716-20.

Kasper S. Treatment-resistant depression: a challenge for future research. *Acta Neuropsychiatr.* 2014; 26(3): 131-3.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981; 5(2): 231-46.

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.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(6): 620-50.

Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, Russell DS, D'Sa C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacol.* 2008; 33(7): 1545-58.

Kotamraju S, Kalivendi SV, Konorev E, Chitambar CR, Joseph J, Kalyanaraman B. Oxidant-induced iron signaling in Doxorubicin-mediated apoptosis. *Methods Enzymol.* 2004; 378:362-82.

Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct.* 2002; 20(2):171-5.

Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2001; 1:47-61.

Lafleur DL, Pittenger C, Kelmendi B, Gardner T, Wasylink S, Malison RT, Sanacora G, Krystal JH, Coric V. N-acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacol.* 2006; 184(2): 254-6.

Lee CH, Park JH, Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Ryu PD, Kim DH, Kwon YG, Kim YM, Won MH. Pre- and post-treatments with escitalopram protect against experimental ischemic neuronal damage via regulation of BDNF expression and oxidative stress. *Exp Neurol.* 2011; 229(2): 450-9.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233:346-57.

Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012; 380(9859): 2224-60.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J Psychiatr Res.* 2009a; 43(9): 864-69.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int.* 2009b; 54(5-6): 358-62.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28(2): 209-24.

Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V, Jr., da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, Gentil V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett.* 2007; 421(1): 33-6.

Machado-Vieira R, Salvadore G, DiazGranados N, Ibrahim L, Latov D, Wheeler-Castillo C, Baumann J, Henter ID, Zarate CA Jr. New therapeutic targets for mood disorders. *Scientific WorldJournal*. 2010; 10:713-26.

Maes M, Christophe A, Delanghe J, Altamura C, Neels H, Meltzer HY. Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. *Psychiatry Res*. 1999; 85(3): 275-91.

Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, Kubera M, Bob P, Lerer B, Maj M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*. 2009; 24(1): 27-53.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Increased plasma peroxides and serumoxidized lowdensity lipoprotein antibodies in major depression: Markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. *J Affect Disord*. 2010; 125(1-3): 287-94.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011a; 35(3): 676-92.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Leunis JC, Geffard M. IgM-mediated autoimmune responses directed against multiple neopeptides in depression: new pathways that underpin the inflammatory and neuroprogressive pathophysiology. *J Affect Disord*. 2011b; 135(1-3): 414-18.

Maes M, Fišar Z, Medina M, Scapagnini G, Nowak G, Berk M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates-Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacol*. 2012; 20(3): 127-50.

Magalhães PV, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, Jeavons S, Schapkaity I, Anderson-Hunt M, Berk M. N-acetylcysteine for major depressive episodes in bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr*. 2011; 33(4): 374-8.

Magalhães PV, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Berk M. A preliminary investigation on the efficacy of N-acetyl cysteine for mania or hypomania. *Aust N Z J Psychiatry*. 2013; 47(6): 564-8.

Maletic V, Raison C. Integrated neurobiology of bipolar disorder. *Front Psychiatry*. 2014; 5:98.

Malhi GS, Berk M. Does dopamine dysfunction drive depression? *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 2007; (433):116-24.

Manji HK, Lenox RH. Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry*. 1999; 46(10): 1328-51.

Manji HK, Moore GJ, Rajkowska G, Chen G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry*. 2000; 5(6):578-93.

Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. 2001; 7(5): 541-7.

Manji HK, Duman RS. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol bulletin*. 2001; 35(2): 5-49.

Manji HK, Zarate CA. Molecular and cellular mechanisms underlying mood stabilization in bipolar disorder: implications for the development of improved therapeutics. *Mol Psychiatry*. 2002; 7(1): 1-7.

Martocchia A, Curto M, Toussan L, Stefanelli M, Falaschi P. Pharmacological strategies against glucocorticoid-mediated brain damage during chronic disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2011; 6(3): 196-204.

Marx CE, Yuan P, Kilts JD, Madison RD, Shampine LJ, Manji HK. Neuroactive steroids, mood stabilizers, and neuroplasticity: alterations following lithium and changes in Bcl-2 knockout mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11(4): 547-52.

Mathew SJ, Manji HK, Charney DS. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(9): 2080-92.

Matthews PR, Harrison PJ. A morphometric, immunohistochemical, and in situ hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder, schizophrenia, and suicide. *J Affect Disord*. 2012; 137(1-3): 125-34.

McKnight RF, Adida M, Budge K, Stockton S, Goodwin GM, Geddes JR. Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012; 379(9817): 721-28.

Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Maeda K, Ashby CR Jr, Kawahara R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr*. 2006; 30(6): 1155-8.

Moszczynska A, Turenne S, Kish SJ. Rat striatal levels of the antioxidant glutathione are decreased following binge administration of methamphetamine. *Neurosci Lett*. 1998; 255(1): 49-52.

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; 45:46-62.

Mu D, Chang YS, Vexler ZS, Ferriero DM. Hypoxia-inducible factor 1 alpha and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. *Exp Neurol*. 2005; 195(2): 407-15.

Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997; 349(9063): 1436-42.

Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380(9859): 2197-223.

Muscat R, Papp M, Willner P. Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal model of depression. *Biol Psychiatry*. 1992; 31(9): 937-46.

Myint AM. Inflammation, neurotoxins and psychiatric disorders. *Mod Trends Pharmacopsychiatri*. 2013; 28:61-74.

Nakagawa Y, Ishima T, Ishibashi Y, Tsuji M, Takashima T. Involvement of GABAB receptor systems in experimental depression: baclofen but not bicuculline exacerbates helplessness in rats. *Brain Res*. 1996; 741(1-2): 240-5.

Nováková M, Praško J, Látalová K, Sládek M, Sumová A. The circadian system of patients with bipolar disorder differs in episodes of mania and depression. *Bipolar Disord*. 2014. (*in press*)

Ogita K, Kitago T, Nakamuta H, Fukuda Y, Koida M, Ogawa Y, Yoneda Y. Glutathione-induced inhibition of Na<sup>+</sup>-independent and -dependent bindings of L-[<sup>3</sup>H]glutamate in rat brain. *Life Sci*. 1986; 39(25): 2411-8.

Okada A. Acute renal failure induced by markedly decreased appetite secondary to a depressive episode after discontinuation of

long-term lithium therapy in an elderly patient with bipolar disorder. *BMJ Case Rep*. 2014. (*in press*)

Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol*. 2004; 19(2): 89-95.

Park MJ, Lee SK, Lima MA, Chung HS, Cho SI, Jang CG. Effect of alpha-tocopherol and deferoxamine on methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 2006; 1109(1):176-82.

Patton GC, Coffey C, Romaniuk H, Mackinnon A, Carlin JB, Degenhardt L, Olsson CA, Moran P. The prognosis of common mental disorders in adolescents: a 14-year prospective cohort study. *Lancet*. 2014; 383(9926): 1404-11.

Pero RW, Roush GC, Markowitz MM, Miller DG. Oxidative stress, DNA repair, and cancer susceptibility. *Cancer Detect Prev*. 1990; 14(5): 555-61.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(1): 88-109.

Prass K, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Magow D, Priller J. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22(5): 520-5.

Proença MB, Dombrowski PA, Da Cunha C, Fischer L, Ferraz AC, Lima MM. Dopaminergic D2 receptor is a key player in the substantia nigra pars compacta neuronal activation mediated by REM sleep deprivation. *Neuropharmacology*. 2014; 76: 118-26.

Reed DJ, Fariss MW. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev*. 1984; 36(2): 25-33.

Reimund E. The free radical flux theory of sleep. *Med Hypotheses*. 1994; 43(4): 231-33.

Réus GZ, Stringari RB, Kirsch TR, Fries GR, Kapczinski F, Roesler R, Quevedo J. Neurochemical and behavioural effects of acute and chronic memantine administration in rats: Further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? *Brain Res Bull*. 2010; 81(6): 585-9.

Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Ferraro AK, Vitto MF, Cesconetto P, Souza CT, Quevedo J. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. *Behav Brain Res*. 2011; 221(1): 166-71.

Réus GZ, Abelaira HM, Stringari RB, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Memantine treatment reverses anhedonia, normalizes corticosterone levels and increases BDNF levels in the prefrontal cortex induced by chronic mild stress in rats. *Metab Brain Dis*. 2012; 27(2): 175-82.

Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Fraga DB, Santos PM, Ferreira GK, Hermani FV, Comim, CM, Quevedo J, Streck EL. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. *Brain Res Bull*. 2009; 79(6): 418-21.

- 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; 28(3): 233-7.
- Rodgers RJ, Cao B-J, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian J Med Biol Res.* 1997; 30(3):289-304.
- Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther.* 2014; 141(2): 150-9.
- Sahin E, Gumuslu S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res.* 2004; 155: 241-8.
- Scott J, Pope M. Nonadherence with Mood Stabilizers: Prevalence and Predictors. *J Clin Psychiatry.* 2002; 63(5): 384-90.
- Shastry BS. Bipolar disorder: an update. *Neurochem Int.* 2005; 46(4):273-9.
- Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Styczeń K, Szewczyk B, Kotarska K, Misztakk P, Pilc A, Wolak M, Nowak G. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep.* 2013; 65(6): 1558-71.
- Souery D, Oswald P, Massat I, Bailer U, Bollen J, Demyttenaere K, Kasper S, Lecrubier Y, Montgomery S, Serretti A, Zohar J, Mendlewicz J; Group for the Study of Resistant Depression. Clinical factors associated with treatment resistance in major depressive disorder: results from a European multicenter study. *J Clin Psychiatry.* 2007; 68(7): 1062-70.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(6):2046-50.
- 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(9):1295-301.
- Stork C; Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Molecular Psychiatry.* 2005; 10(10): 900-19.

Subramaniam M, Abdin E, Vaingankar JA, Chong SA. Prevalence, correlates, comorbidity and severity of bipolar disorder: results from the Singapore Mental Health Study. *J Affect Disord.* 2013; 146(2):189-96.

Teyssier JR, Ragot S, Cauvet-Gélinier JC, Trojak B, Bonin B. Expression of oxidative stress-response genes is not activated in the prefrontal cortex of patients with depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2011; 186(2-3): 244-7.

Tohen M, Vieta E. Antipsychotic agents in the treatment of bipolar mania. *Bipolar Disord.* 2009; 11(Suppl 2): 45-54.

Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LR, Mello MT. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Cienc.* 2009; 81(3): 521-38.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.

Valvassori SS, Petronilho FC, Réus GZ, Steckert AV, Oliveira VB, Boeck CR, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(4):1064-8.

Valvassori SS, Arent CO, Quevedo J. Modelos animais de transtornos psiquiátricos. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos.* 3. ed Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 99-110.

Valvassori SS, Arent CO, Steckert AV, Varela RB, Jornada LK, Tonin PT, Budni J, Mariot E, Kapczinski F, Quevedo J. Intracerebral Administration of BDNF Protects Rat Brain Against Oxidative Stress Induced by Ouabain in an Animal Model of Mania. *Mol Neurobiol.* 2014. (*In press.*)

Varga V, Jenei Z, Janáky R, Saransaari P, Oja SS. Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem Res.* 1997; 22(9): 1165-71.

Vieta E, Azorin JM, Bauer M, Frangou S, Perugi G, Martinez G, Schreiner A. Psychiatrists' perceptions of potential reasons for non- and partial

adherence to medication: results of a survey in bipolar disorder from eight European countries. *J Affect Disord.* 2012; 143(1-3):125-30.

Vollert C, Zagaar M, Hovatta I, Taneja M, Vu A, Dao A, Levine A, Alkadhi K, Salim S. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav Brain Res.* 2011; 224: 233-40.

Weiss JM, Kilts CD. Animal models of depression and schizophrenia. In: Schatzberg AF, Nemeroff CB, editors. *Textbook of psychopharmacology.* Washington (DC): American Psychiatric Press Inc, 1998. p. 89-131.

Woo KJ, Lee TJ, Park JW, Kwon TK. Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1 $\alpha$  accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343(1): 8-14.

Yildiz-Yesiloglu A, Ankerst DP. Neurochemical alterations of the brain in bipolar disorder and their implications for pathophysiology: a systematic review of the in vivo proton magnetic resonance spectroscopy findings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006; 30(6): 969-95.

Yu H, Chen ZY. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin.* 2011; 32(1): 3-11.

Zafir A, Ara A, Banu N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33(2): 220-8.

Zarate CA Jr, Tohen M, Banov MD, Weiss MK, Cole JO. Is clozapine a mood stabilizer? *J Clin Psychiatry.* 1995; 56(3): 108-12.

Zarate, CA JR, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2006; 63(8): 856-64.

Zhang X, Xie W, Qu S, Pan T, Wang X, Le W. Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333(2): 544-9.

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; 27(12):4328-39.

## ANEXO 1

	<b>Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC</b>	
	<b>Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA</b>	
<b>Resolução</b>		
O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 1153/95 (Lei Arouca), analisou o projeto abaixo.		
<b>Projeto: 15/2010</b>		
<b>Pesquisador:</b>		
João Qüevedo		
<b>Título:</b> "Estudo dos efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração de N-acetilcisteína e deferoxamina em ratos submetidos ao modelo animal de estresse crônico moderado".		
Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com a Lei Federal 1153/95 – Lei Arouca. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA.		
Criciúma, 15 de abril de 2010.		
		
Carina Rodrigues Boeck		
Coordenadora do CEUA		

## ANEXO 2

**Resolução**

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

**Protocolo: 70/2012**

**Professor:**

João Luciano Quevedo

Título: "Avaliação dos efeitos de N-Acetilcisteína e deferoxamina sobre parâmetros comportamentais e de Estresse Oxidativo em um modelo animal de mania induzido por ouabaina

Valuation effects of N-acetylcysteine and deferoxamine on behavioral parameters and Oxidative Stress in an animal model of mania induced by ouabain"

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA. [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua).

Criciúma, 11 de julho de 2012.

*Patricia Fernanda Schuck*  
Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA

## ANEXO 3

**Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA****Resolução**

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

**Protocolo: AD-70/2013**

**Professor Responsável:** João Luciano Quevedo.

**Título:** "Avaliação dos efeitos de N-Acetilcisteína e deferoxamina sobre parâmetros comportamentais e de Estresse Oxidativo em um modelo animal de mania induzido por ouabaina"

Este adendo foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização 192 ratos camundongos Black. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail [ceua@unesp.net](mailto:ceua@unesp.net).

Criciúma, 26 de novembro de 2013.

Patricia Fernanda Schuck  
Coordenadora da CEUA