

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

SAMIRA DA SILVA VALVASSORI

**CONSOLIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE
TRANSTORNO BIPOLAR INDUZIDO PELA
ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE
OUABAÍNA EM RATOS**

**CRICIÚMA
2014**

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

SAMIRA DA SILVA VALVASSORI

**CONSOLIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE
TRANSTORNO BIPOLAR INDUZIDO PELA
ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE
OUABAÍNA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.Dr. João Quevedo

**CRICIÚMA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V215c Valvassori, Samira da Silva .

Consolidação de um modelo animal de transtorno bipolar induzido pela administração intracerebroventricular de ouabaína em ratos / Samira da Silva Valvassori ; orientador: João Quevedo. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.
106 p : il. ; 21 cm.

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

1. Transtorno bipolar – Tratamento. 2. Psicose maníaco-depressiva. 3. Ouabaína. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD. 22ª ed. 615.1

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UNESC.

Parte do trabalho, no que diz respeito aos ensaios bioquímicos, foi realizada no Laboratório de Psicofarmacologia da Universidade de Toronto, Canadá (*Laboratory of Psychopharmacology, University of Toronto, Canada*).

“Dedico essa tese de doutorado aos meus pais, Fernandes e Valnete, pelas incansáveis horas de dedicação; aos meus irmãos Bruno e Davi, pela amizade, carinho e diversão nas horas vagas; e ao meu companheiro Augusto, por me ensinar o significado da palavra felicidade.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, o alicerce de minha vida: meus pais, Fernandes Valvassori e Valnete Valvassori, pelo eterno cuidado, dedicação e amor; pelo apoio nos momentos difíceis e de inquietantes decisões; por estarem ao meu lado a cada passo, a cada pequena conquista e grandes realizações, pois estes não teriam valor se vocês não estivessem comigo. Agradeço aos meus irmãos, Bruno Valvassori e Davi Valvassori, por toda a diversão, companheirismo e amizade. Agradeço à minha avó, Hilda Machado da Silva, por todo o exemplo de luta, garra e trabalho.

Agradeço ao meu amor, Augusto Casagrande, pelo companheirismo em todos os momentos, pelos sorrisos, pelo cuidado carinhoso e por fazer meus sonhos se tornarem realidade. Obrigada à família Casagrande, que me recebeu de braços abertos repletos de carinho. Agradeço em especial aos meus sogros, Maurício e Denise Casagrande, e ao meu cunhado, Gustavo Casagrande, pelo apoio e amizade.

Agradeço ao Dr. João Quevedo, meu chefe e orientador, por acreditar na minha capacidade e no meu crescimento, profissional e pessoal, e por me ensinar a fazer ciência com ética, dignidade e profissionalismo acima de tudo.

Agradeço à Coorientadora deste trabalho, Dra. Josiane Budni, por ser mais do que minha professora, pelos conhecimentos repassados, pelo apoio em todos os momentos e, principalmente, pela amizade.

Agradeço a Camila Orlandi Arent, minha parceira de trabalho, minha amiga e confidente, por todo o carinho, ombro amigo e

momentos de descontração. Aos meus amigos e companheiros de Pós-Graduação, Roger Bitencourt Varela e Wilson Resende, pela grande ajuda nos experimentos, amizade e diversão nos momentos vagos.

Aos alunos de iniciação científica e de apoio técnico, Gustavo Colombo Dal Pont e Daniela Vicente Bavaresco, por todo o esforço, dedicação e trabalho investido nesse trabalho, sem vocês esse trabalho não teria acontecido. Além disso, esse trabalho foi muito mais divertido com vocês!

Ao laboratório de Psicofarmacologia da Universidade de Toronto no Canadá, especialmente aos meus orientadores, Ana Cristina Andreazza e Trevor Young, por me acolher tão carinhosamente e permitir o enriquecimento do meu trabalho.

Agradeço aos meus eternos amigos, Amanda Valnier Steckert, Francielle Mina, Bruna Pescador, Gislaine Zilli Réus, Vanessa J. R. Paula, Nicole Brown e Larisse Chiara, por estarem sempre ao meu lado, mesmo quando separados pela distância e pela correria da vida diária.

Agradeço aos meus professores da graduação e pós-graduação, a UNESC e a todos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, muitíssimo obrigada.

*“Todo mundo é capaz de dominar
uma dor, exceto quem a sente.”*

WILLIAM SHAKESPEARE

RESUMO

O transtorno bipolar (TB) é uma condição psiquiátrica complexa, caracterizada por mudanças recorrentes do humor, incluindo episódios maníacos, depressivos e mistos. Este complexo curso clínico faz com que o desenvolvimento de um modelo animal de TB adequado seja um desafio para os pesquisadores da área. Dentre outros modelos, a administração intracerebroventricular (i.c.v) de ouabaína, um potente inibidor da enzima Na⁺K⁺ATPase, em ratos tem sido considerado um bom modelo animal de mania. Entretanto, ainda não existem modelos de experimentação que mimetizam sintomas de ambos os polos do humor, mania e depressão, em um mesmo animal. O objetivo do presente estudo foi avaliar comportamentos tipo-maníaco e tipo-depressivo e alterações cognitivas, neuroquímicas e fisiológicas após a administração i.c.v de ouabaína em ratos Wistar. Além disso, avaliar os efeitos dos estabilizadores do humor, lítio (Li) e valproato (VPA) e do antidepressivo imipramina (IMI) sobre as alterações comportamentais, neuroquímicas e fisiológicas induzidas pela ouabaína. Nossos resultados mostraram que, 7 dias após a administração i.c.v de ouabaína, os animais apresentaram hiperlocomção no teste do campo aberto e que o tratamento com Li ou VPA reverteu este efeito. Posteriormente, foi demonstrado que 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína, não houve alteração locomotora dos animais no teste do campo aberto, porém os animais apresentaram comportamento tipo-depressivo, indicado pelo aumento do tempo imobilidade no teste do nado forçado e diminuição do consumo de sacarose no teste de anedonia. O tratamento com Li, VPA, IMI ou o tratamento combinado IMI com Li ou VPA reverteram as alterações comportamentais tipo-depressivas induzidas pela ouabaína, exceto o tratamento com Li ou VPA que reverteram parcialmente o comportamento tipo-anedônico nos animais. A ouabaína causou dano cognitivo tanto no teste da esquiwa inibitória quanto no teste de reconhecimento de objetos, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína. Além disso, houve um aumento do peso da glândula adrenal, bem como um aumento dos níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no soro destes animais. Li, VPA, IMI ou o tratamento adjunto de Li ou VPA com IMI reverteram a diminuição dos níveis de ACTH induzida pela ouabaína. Enquanto que somente Li, VPA ou o tratamento combinado dos estabilizadores do humor, Li ou VPA, com IMI conseguiram reverter o aumento da glândula adrenal induzida pela ouabaína. A ouabaína diminuiu os níveis de pró-BDNF, BDNF, receptor

TrkB e pCREB; entretanto, essas alterações variaram de acordo com o protocolo experimental e com a estrutura cerebral avaliada. A ouabaína, em ambos os protocolos experimentais, aumentou o dano oxidativo, a proteínas e a lipídeos, e alterou a atividade das enzimas antioxidantes no cérebro dos animais. O tratamento com Li reverteu todos os danos oxidativos e as alterações nas enzimas antioxidantes induzidas pela ouabaína. Juntos os resultados do presente estudo indicam que a administração i.c.v de ouabaína em modelos pré-clínicos pode ser não somente um modelo para episódios tipo-maniacos, mas, também para episódios tipo-depressivos, já que a administração de ouabaína induz também o fenótipo tipo-depressivo. Outro ponto importante é que o modelo proposto no presente estudo também mimetiza alterações neuroquímicas importantes, como o estresse oxidativo e alterações na via de BDNF, ambos vistos em pacientes bipolares.

Palavras-chave: transtorno bipolar; mania; depressão; ouabaína; estresse oxidativo; BDNF.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) presents a complex alternating clinical course with recurrent mood switches including manic and depressive episodes making the development of an adequate animal model challenging. Ouabain, a potent Na⁺K⁺ATPase inhibitor, intracerebroventricular (i.c.v) administration in preclinical models has been suggested as a model of mania. However, to date, there are no models that mimic mood episodes, mania and depression, in the same animal. The aim of our study was to evaluate manic- and depressive-like behaviors and cognitive, physiological and neurochemical alterations after a single ouabain i.c.v administration in Wistar rats. Moreover, evaluate the effects of the mood stabilizers, lithium (Li) and valproate (VPA), and the antidepressant imipramine (IMI) on behavioral, physiological and neurochemical alterations induced by ouabain. Spontaneous locomotor activity behavior in rats was significantly increased 7 days after ouabain injection compared to control, while Li and VPA reversed this ouabain-induced manic-like behavior. Locomotor activity returned to its basal levels 14 days after ouabain injection. However, 14 days after ouabain injection, was observed depressive-like behavior in the animals, such as increase in the immobility time in the forced-swimming test and decrease in the sucrose consumption. The IMI treatment and the adjunctive treatment of Li or VPA with IMI reversed the depressive-like behavior induced by ouabain. However, Li or VPA, per se, partially reversed these behavioral alterations induced by ouabain. Additionally, depressive-like animals showed cognitive impairment in the inhibitory avoidance task and in the object recognition task. The adrenal gland weight was increased after ouabain administration, which was accompanied by an ACTH serum level increased in the depressive-like animals. Li, VPA or the adjunctive treatment of Li or VPA with IMI were able to reverse the adrenal weight increased induced by ouabain. The mood stabilizers and the adjunctive treatment of mood stabilizer, Li or VPA plus IMI reversed the ACTH levels increased induced by ouabain. Ouabain decreased the levels of pro-BDNF, BDNF, TrkB and CREB in the brains of rats after i.c.v administration; however this effect varies depending of the experimental protocol and the brain region evaluated. The ouabain administration induced oxidative damage and antioxidant enzymes alterations in the frontal cortex and hippocampus of rats, and Li was able to reverse these impairments. We propose that the ouabain i.c.v administration in preclinical models may be not only a

model for manic episodes but also for depressive ones because our results strongly support that ouabain administration leads to a depressive-like phenotype. Another important point is that the proposed model in this study mimics important neurochemical changes, such as oxidative stress and BDNF pathway alterations, which are also seen in bipolar patients.

Keywords: bipolar disorder; mania; depression; ouabain; oxidative stress; BDNF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teste do nado forçado.	30
Figura 2 - Desenho esquemático do eixo HPA.	31
Figura 3 - Desenho esquemático da Na ⁺ K ⁺ ATPase.	33
Figura 4 - Desenho esquemático da formação de superóxido (O ₂ ⁻) durante a fosforilação oxidativa.	35
Figura 5 - Reação de Fenton e reação de Haber-Weiss.	36
Figura 6 - Vias de sinalização ativadas pelo complexo BDNF/TrkB...41	
Figura 7 - Esquema mostrando o desenho experimental do teste do campo aberto, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de líquido cefalorraquidiano artificial ou ouabaína em ratos.	45
Figura 8 - Esquema mostrando o desenho experimental do teste do nado forçado e teste do consumo de sacarose, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína em ratos.	45
Figura 9 - Esquema mostrando o desenho experimental do teste da esQUIVA inibitória e teste do reconhecimento de objetos, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína em ratos.	46
Figura 10 - Esquema mostrando o desenho experimental em que foi avaliado os efeito dos estabilizadores do humor, lítio e valproato, sobre o teste do campo aberto, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína em ratos.	48
Figura 11 - Esquema mostrando o desenho experimental em que foi avaliado os efeito dos estabilizadores do humor, lítio e valproato, e do antidepressivo imipramina sobre o teste do nado forçado e o teste do consumo de sacarose, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína em ratos.	49
Figura 12 - Ilustração do teste da esQUIVA inibitória.	52

Figura 13 - Ilustração do teste de reconhecimento de objetos.	53
Figura 14 - Atividade locomotora e exploratória, 7 dias e 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína.	58
Figura 15 - Teste do nado forçado e do consumo de sacarose 14 dias após a administração de LCR ou ouabaína.	58
Figura 16 - Avaliação de parâmetros de alteração do eixo HPA 14 dias após a administração de LCR ou ouabaína.	59
Figura 17 - Avaliação da memória aversiva e da memória de reconhecimento de objetos, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína.	59
Figura 18 - Níveis de pró-BDNF e de BDNF, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína.	60
Figura 19 - Níveis de TrkB, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína.	61
Figura 20 - Níveis de pCREB no córtex frontal e no hipocampo de ratos, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína.	61
Figura 21 - Efeitos dos estabilizadores do humor, lítio e valproato, sobre a atividade locomotora, e exploratória, avaliados no teste do campo aberto, 7 dias após a administração i.c.v de ouabaína nos ratos.....	62
Figura 22 - Efeitos dos estabilizadores do humor, lítio e valproato, e do antidepressivo imipramina sobre a atividade locomotora e exploratória, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína.	62
Figura 23 - Efeitos dos estabilizadores do humor, lítio e valproato, e do antidepressivo imipramina sobre os testes do nado forçado e o do consumo de sacarose, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína.	63
Figura 24 - Efeitos dos estabilizadores do humor, lítio e valproato, e do antidepressivo imipramina sobre os níveis de ACTH e o peso da	

glândula adrenal, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. 64

Figura 25 - Efeitos do lítio sobre os parâmetros de dano oxidativo à lipídeos, LPH, MDA, HNE e 8-ISO, 7 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. 66

Figura 26 - Efeitos do lítio sobre os parâmetros de dano oxidativo à lipídeos, LPH, MDA, HNE e 8-ISO, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. 67

Figura 27 - Efeitos do lítio sobre os parâmetros de dano oxidativo a proteínas, carbonilação de proteínas e 3-nitrotirosina, 7 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. 68

Figura 28 - Efeitos do lítio sobre os parâmetros de dano oxidativo a proteínas, carbonilação de proteínas e 3-nitrotirosina, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. 69

Figura 29 - Efeitos do lítio sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, 7 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. .. 70

Figura 30 - Efeitos do lítio sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. 71

Figura 31 - Efeitos do lítio sobre a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR, 7 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. 72

Figura 32 - Efeitos do lítio sobre a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. 73

Figura 33 - Consequências da diminuição da atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ sobre a plasticidade e crescimento neuronal. 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio singlet

4-HNE - 4-hidroxinonenal

8-ISO - 8-isoprostano

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

ATP - Adenosina trifosfatase

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CAT - Catalase

CREB - Elemento de resposta ao AMPc

CRF - Fator de liberação da corticotrofina

ERK- Proteína quinase regulada por sinais extracelulares

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GSH - Glutaciona reduzida

GSK-3- Glicogênio sintase kinase-3

GST - Glutaciona S-transferase

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

i.c.v - Intracerebroventricular

Li - Lítio

LPH - Hidroperóxido de lipídeo

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MDA - Malondialdeído

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

NGF - Fator neurotrófico de crescimento neuronal

NT-3 - Neurotrofina-3

NT-4 - Neurotrofina-4

O₂^{•-} - Ânion superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PLCy - Fosfolipase Cy

SOD - Superóxido dismutase

TB - Transtorno bipolar

Trk - Tirosina kinase

VADAC - Canal iônico dependente de voltagem

VPA - Valproato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Transtorno bipolar	23
1.2 Transtorno bipolar e alterações cognitivas	24
1.3 Tratamento farmacoterápico no transtorno bipolar	26
1.4 Modelo animal de transtorno bipolar induzido por ouabaína	27
1.5 Como a “mania” e a “depressão” podem ser analisados em animais de laboratório?.....	29
1.6 Alterações da Na ⁺ K ⁺ ATPase no transtorno bipolar.....	32
1.7 O estresse oxidativo no transtorno bipolar	34
1.8 O papel do BDNF no transtorno bipolar	39
1.9 JUSTIFICATIVAS do trabalho.....	42
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Aspectos éticos	44
3.2 Animais experimentais	44
3.3 Procedimentos cirúrgicos	44
3.4 Desenho experimental	44
3.4.1 Administração de ouabaína - validação de face do modelo animal de TB.....	44
3.4.2 Avaliação dos efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI em animais submetidos à administração i.c.v de ouabaína em ratos – validação preditiva do modelo.....	47
3.5 Testes comportamentais	49
3.5.1 Teste do campo aberto.....	49
3.5.2 Teste do nado forçado.....	50
3.5.3 Teste do consumo de sacarose	50

3.5.4 Teste da esquiua inibitória.....	51
3.5.5 Teste do reconhecimento de objetos	52
3.6 Análises bioquímicas	54
3.6.1 Punção cardíaca e extração da adrenal	54
3.6.2 Preparo das amostras cerebrais	54
3.6.3 Análise dos níveis de ACTH e corticosterona	54
3.6.4 Avaliação de pró-BDNF, BDNF e CREB, através de Western Blot	54
3.6.5 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo	55
3.6.5.1 Peroxidação lipídica	55
3.6.5.2 Oxidação e nitração proteica	56
3.6.5.3 Atividade das enzimas antioxidantes.....	56
3.7 Análises Estatísticas	57
4 RESULTADOS.....	57
5 DISCUSSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O transtorno bipolar (TB) é uma condição psiquiátrica complexa, caracterizada por mudanças recorrentes do humor, incluindo episódios maníacos, depressivos e mistos (Judd et al., 2003; Kupka et al., 2007). O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, DSM-IV, distingue pacientes com TB do tipo I, TB do tipo II e ciclotimia.

A principal característica do TB do tipo I é um curso clínico marcado pela ocorrência de um ou mais episódios maníacos ou episódios mistos. Comumente, pacientes bipolares do tipo I também apresentam um ou mais episódios depressivos maiores ao longo da vida. Por outro lado, o TB do tipo II é caracterizado pela ocorrência de um ou mais episódios depressivos maiores, acompanhados por pelo menos um episódio hipomaníaco. E finalmente, o transtorno ciclotímico, o qual envolve múltiplos períodos de sintomas hipomaníacos e de sintomas depressivos. Na ciclotimia os sintomas, tanto os hipomaníacos quanto os depressivos, têm número, gravidade, abrangência ou duração insuficientes para a satisfação dos critérios para o diagnóstico do TB do tipo I ou do tipo II (American Psychiatric Association, 2002).

Durante um episódio maníaco o paciente apresenta o humor elevado, expansivo ou irritável e, de acordo com os critérios para o diagnóstico, esta alteração do humor deve durar pelo menos uma semana - ou menos, caso a hospitalização seja exigida. A fase depressiva do TB é caracterizada por humor deprimido e ou perda de prazer pelas atividades (anedonia), os quais devem ser acompanhados por pelo menos cinco dos seguintes sintomas: insônia ou hipersonia, significativa perda ou ganho de peso, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimento de inutilidade ou culpa excessiva, redução da capacidade de concentração e ideias recorrentes de morte ou suicídio. É importante salientar que, para cumprir o critério diagnóstico de TB, estes sintomas, tanto os de mania quanto os de depressão, devem afetar de uma maneira importante as atividades sociais e profissionais do indivíduo (Organização Mundial de Saúde, 1994).

O TB está entre as condições médicas mais incapacitantes e tem sido visto como um problema de saúde pública em todo o mundo (Hyman et al., 2006). Um importante estudo da Organização Mundial de Saúde sobre o “Impacto Global das Doenças” faz uma previsão para o ano de 2020 colocando o TB como a sexta causa médica de

incapacidade (Lopez e Murray, 1998). O TB é relativamente frequente, apresentando taxas de prevalência ao longo da vida variando entre 1% (TB do tipo I) até 5% ou mais quando incluídas todas as categorias de TB representadas no DSM-IV (TB do tipo II e ciclotimia) (Kessler et al., 2005).

É importante ressaltar também o grande sofrimento do paciente e da família que acompanha esse transtorno, além da alta taxa de suicídio trazida pelos pacientes não tratados. Dentre os transtornos psiquiátricos, o TB está associado ao maior risco de mortalidade prematura, como resultado de complicações associadas a co-morbidades clínicas, sendo o suicídio o maior responsável por essa condição (Goodwin e Jamison, 2003). Estima-se que a incidência de suicídio no TB é de 390 casos a cada 100 mil pacientes por ano, ou seja, 28 vezes maior do que na população geral. Cerca de 40% dos pacientes vão fazer uma tentativa de suicídio ao longo da vida e cerca de $\frac{1}{4}$ irão morrer por suicídio (Goodwin e Jamison, 2003).

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

Outro ponto importante que deve ser ressaltado é a significativa disfunção cognitiva que os pacientes com TB apresentam. Estudos tem demonstrado que esses pacientes possuem tanto disfunções cognitivas quanto dificuldades em seu funcionamento psicossocial, não somente durante os episódios do transtorno, mas também durante os estados de eutimia (Martínez-Arán et al., 2000; Goetz et al., 2007).

1.2 TRANSTORNO BIPOLAR E ALTERAÇÕES COGNITIVAS

O estudo do funcionamento cognitivo no TB tem despertado interesse crescente, especialmente, ao longo da última década. Os pesquisadores têm focado principalmente no rendimento cognitivo destes pacientes durante os períodos de eutimia. Como descrito previamente neste trabalho, pacientes com TB apresentam importante comprometimento cognitivo, até mesmo durante a eutimia, e piora a

cada episódio de humor (Martínez-Arán et al., 2004 a; b; Robinson e Ferrier, 2006). Entre os processos cognitivos alterados no TB encontram-se: função executiva, memória, atenção e cognição social (Wheeler et al., 1997; Hoertnagl et al., 2011).

A função executiva tem sido descrita como a mais prejudicada no TB e estudos recentes têm sugerido que este comprometimento está presente até mesmo em estágios iniciais do transtorno (López-Jaramillo et al., 2010; Torres et al., 2010; Elshahawi et al., 2011; Barbosa et al., 2012). A função executiva possui extrema importância nas habilidades cognitivas envolvidas no planejamento, na iniciação, no seguimento e na coordenação do comportamento, sendo que os módulos corticais responsáveis por essas funções se localizam nos lobos frontais direito e esquerdo (Wheeler et al., 1997). Contudo, dados provenientes de pesquisas clínicas, usando métodos de ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons, têm demonstrado diminuição de massa cinzenta e branca em áreas do córtex pré-frontal de pacientes bipolares (Drevets et al., 1997; Bruno et al., 2004; Bruno et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que a capacidade de reconhecer expressões faciais emocionais, fundamental para a interação social bem sucedida, está prejudicada em pacientes com TB - principalmente em indivíduos bipolares do tipo I (Derntl et al., 2009; Hoertnagl et al., 2011). As áreas cerebrais ativadas durante o teste de estímulos faciais são aquelas cruciais para o processamento da emoção, tais como o córtex pré-frontal e amígdala (Hariri et al., 2002). Vários estudos têm demonstrado, a partir de tomografia por ressonância magnética, que pacientes bipolares possuem amígdala maior, quando comparada com voluntários saudáveis (Altshuler et al., 1998; Strakowski et al., 1999).

Déficits em funções relacionadas à memória declarativa, a qual está diretamente ligada ao hipocampo, têm sido consistentemente relatados no TB e estão presentes em todos os estados de humor, inclusive na eutímia (Wolfe et al., 1987; van Gorp et al., 1999; Clark et al., 2001; Cavanagh et al., 2002; Deckersbach et al., 2004; Martínez-Arán et al., 2004 a; b; Robinson et al., 2006). Além disso, estudos *postmortem* e de neuroimagem demonstraram alterações estruturais e neuroquímicas no hipocampo de pacientes bipolares, incluindo diminuição da densidade celular, alterações em marcadores de funcionamento e de plasticidade neuronal e diminuição do volume hipocampal (Swayze et al., 1992; Noga et al., 2001; Strasser et al., 2005; Bearden et al., 2008; Chepenik et al., 2009).

Tendo em vista que indivíduos bipolares possuem danos graves no desempenho cognitivo, na saúde e no bem estar geral e que estes são

piorados a cada episódio de humor, a prevenção de episódios futuros e a manutenção de episódios agudos são os principais objetivos do tratamento do TB. A prática clínica e diversos estudos apontam que quanto mais incisivo e precoce o tratamento, maiores as chances de recuperação e redução de danos cognitivos (Kapczinski et al., 2008a).

1.3 TRATAMENTO FARMACOTERÁPICO NO TRANSTORNO BIPOLAR

O tratamento farmacológico do TB está direcionado principalmente para a fase aguda do transtorno, no qual o objetivo é tratar o paciente com mania ou depressão, para a recuperação sintomática, levando-o ao estado de eutímia. Além disso, o tratamento de manutenção ou profilaxia é fundamental no TB para a prevenção de episódios, de mania e/ou depressão, e maximizar a recuperação funcional, ou seja, que o paciente continue em remissão. Entretanto, o tratamento de ambas as fases do transtorno pode ser complexo, porque antidepressivos podem causar mania ou hipomania no paciente bipolar e os tratamentos que agem sobre os episódios maníacos, em alguns casos, podem levar a depressão (Geddes e Miklowitz, 2013).

O único fármaco aprovado especificamente para o tratamento do TB é o lítio (Li), um estabilizador do humor. Porém outros fármacos podem ser utilizados para o tratamento deste transtorno. Entre esses fármacos encontram-se anticonvulsivantes [carbamazepina, oxcarbazepina, valproato de sódio (VPA)], alguns antipsicóticos típicos (haloperidol, clorpromazina) e antipsicóticos atípicos (aripirazol, clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, ziprasidona, asenapina). Estes fármacos juntamente com o Li podem ser combinados para o tratamento agudo, de continuação e manutenção do TB (Bowden 2009; Haddad et al., 2009; Tohen e Vieta, 2009).

Os fármacos mais prescritos e estudados no TB são o Li e o VPA e, apesar de grande parte dos mecanismos de ação permanecer desconhecidos, alguns alvos bioquímicos desses medicamentos foram descritos (Zarate et al., 2006; Bachmann et al., 2009). É interessante salientar que, embora Li e VPA tenham estruturas químicas extremamente diferentes – Li é um cátion monovalente e VPA é um ácido carboxílico – possuem alguns mecanismos em comum. Entre as propriedades mais bem descritas destes estabilizadores do humor encontram-se a neuroprotetoras e neurotrófica, as quais melhoram os prejuízos associados à plasticidade e resiliência celular, ambas prejudicadas na fisiopatologia do TB (Zarate et al., 2006; Bachmann et

al., 2009; Schloesser et al., 2012).

Além dos fármacos acima citados, utilizados principalmente no tratamento da fase maníaca, há de se ressaltar os fármacos utilizados durante a fase da depressão bipolar. O tratamento desta fase é um desafio na prática clínica, pois, o uso de antidepressivos possui um risco muito grande no desencadeamento do episódio de mania. Os antidepressivos mais usados para tratar a depressão em pacientes bipolares são os inibidores da recaptação de serotonina e a bupropiona – um inibidor da recaptação de dopamina (Sachs et al., 2000). Embora estes fármacos tenham mostrado sua eficácia no tratamento da depressão unipolar, não existem estudos que forneçam suporte para guiar a prática clínica sobre o uso de antidepressivos no TB (Ghaemi, et al., 2001; Sachs et al., 2007). Levando em consideração que pacientes bipolares possuem danos graves que são acentuados a cada episódio do humor, a escolha da farmacoterapia para o tratamento da depressão bipolar não depende somente do conhecimento sobre a eficácia do medicamento, mas também dos riscos associados (Ghaemi, et al., 2001).

Embora tenha sido um grande avanço o tratamento do TB com Li, anticonvulsivantes, antipsicóticos atípicos e antidepressivos, muitos pacientes não toleram ou respondem adequadamente a esses fármacos (Keck, 2003). Além disso, há mais de 50 anos, desde a identificação dos efeitos antimaniacos de Li, não foram desenvolvidos outros fármacos específicos para o tratamento do TB, que tenha uma ação precisa em ambos os polos do humor, exigindo novas abordagens terapêuticas.

A dificuldade para o desenvolvimento de novos fármacos para o TB está associada a falta de conhecimento sobre a precisa fisiopatologia desse transtorno. Modelos animais tem sido uma ferramenta importante para o estudo da neurobiologia do TB e para o teste de novos fármacos. Entretanto, a complexidade envolvida no desenvolvimento de um modelo animal adequado para o TB tem sido um importante desafio para os pesquisadores da área (Manji e Chen, 2002; Einat et al., 2003).

1.4 MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO BIPOLAR INDUZIDO POR OUABAÍNA

Recentes avanços genéticos, neurobiológicos e farmacológicos têm contribuído para o desenvolvimento de novos modelos animais, os quais tem sido uma ferramenta importante para o estudo de sistemas intracelulares que podem estar envolvidos na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (Manji e Chen, 2002; Einat et al., 2003). Entretanto, nenhum modelo animal, até o momento, mimetiza

totalmente um determinado transtorno psiquiátrico. Principalmente o TB, que apresenta um curso clínico complexo, com alterações de humor recorrentes, incluindo episódios maníacos, depressivos e mistos, tornando o desenvolvimento de um modelo animal adequado um desafio para a comunidade científica (Machado-Vieira et al., 2004).

Ellenbroek e Cools (1990) descreveram previamente os critérios necessários para considerar um modelo animal em transtorno psiquiátrico válido. Entre estes se encontram: mimetizar os sintomas do determinado transtorno (validade de face); reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos do transtorno (validade de construção); os fármacos usados no tratamento do transtorno devem reverter os sintomas induzidos no modelo animal (validade preditiva).

Estudos de nosso e outros grupos de pesquisa têm caracterizado bem o modelo animal de mania induzido pela administração intracerebroventricular (i.c.v) de ouabaína – um potente inibidor da sódio-potássio de adenosina trifosfatase ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$) (Li et al., 1997; Hennion et al., 2002; El-Mallakh et al., 2003; Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011). Os estudos do nosso laboratório demonstram que a reprodução dos sintomas tipo-maníacos - hiperatividade após a injeção i.c.v de ouabaína em ratos – permanece por sete dias após uma única administração (Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011). Neste contexto, contemplando a validade preditiva do modelo, diversos estudos tem mostrado que pacientes bipolares apresentam uma diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, tanto em episódios maníacos quanto em episódios depressivos (Coppen et al., 1966; Shaw, 1966; Looney e El-Mallakh, 1997; Li e El-Mallakh, 2004). Além disso, foi encontrado um aumento de ouabaína endógena, um hormônio produzido pela adrenal e pelo hipotálamo, no córtex parietal de pacientes bipolares quando comparado com controles saudáveis (Goldstein et al., 2006).

Os modelos animais de TB, descritos na literatura atualmente, focam na indução de comportamentos que mimetizam individualmente um episódio agudo de mania ou de depressão. Esses modelos são de considerável valor e muitos deles possuem validade preditiva para identificar fármacos ou compostos com potencial antimaníaco ou antidepressivo (Duman e Monteggia, 2006; Einat e Manji, 2006). A administração de ouabaína em ratos - além de induzir hiperatividade - parece induzir também hipoatividade, que pode ser considerado um sintoma tipo-depressivo. Ambos os sintomas induzidos pela ouabaína são prevenidos pela administração de Li (Li et al., 1997; Jornada et al., 2011). Entretanto, não existe nenhum estudo na literatura que demonstre todos esses aspectos em um único modelo, dificultando o

desenvolvimento de um modelo animal de TB adequado.

Levando em consideração todos os estudos citados anteriormente, a administração i.c.v de ouabaína em ratos possui um grande potencial para ser um modelo animal de transtorno bipolar, pois além de mimetizar aspectos fisiopatológicos, reproduz também os seus principais aspectos comportamentais - mania e depressão - sendo estes, prevenidos pela administração de Li (fármaco clássico utilizado no tratamento do TB) (Li et al., 1997; Jornada et al., 2011). Entretanto, mais testes são necessários para a validação da administração i.c.v de ouabaína em ratos como um modelo animal de TB.

1.5 COMO A “MANIA” E A “DEPRESSÃO” PODEM SER ANALISADOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO?

Há muito tempo os pesquisadores vem tentando desenvolver modelos animais que reproduzam o maior número possível de alterações fisiológicas e comportamentais específicas observadas nos transtornos de humor. Os testes comportamentais são de extrema importância para avaliação da validade de face de um modelo animal, a qual se refere a capacidade do modelo em mimetizar os sintomas de um determinado transtorno psiquiátrico (ver em Valvassori et al., 2013).

Estes testes comportamentais incluem o teste de natação forçada, teste do consumo de sacarose e teste de campo aberto. O teste do nado forçado foi descrito pela primeira vez por Porsolt e colegas (1977) e está entre os testes comportamentais mais utilizados para a avaliação da atividade antidepressiva de substâncias e para avaliar o comportamento tipo-depressivo em modelos animais de depressão. Os roedores, que podem ser ratos ou camundongos, são expostos a uma situação aversiva, nadar em um tanque cilíndrico com água, onde eles não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape). Com o tempo os animais percebem que não tem como sair do local e desenvolvem uma postura de imobilidade. Durante o teste é avaliado a imobilidade e a natação do animal. A imobilidade no teste do nado forçado é interpretada como uma manifestação de humor negativo, representando desesperança no animal, refletindo a falta de motivação, que é um sintoma frequentemente relatado na depressão (**Figura 1**).

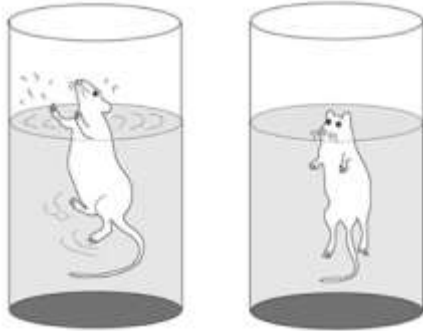


Figura 1. Teste do nado forçado. O teste do nado forçado é usado para avaliar o comportamento tipo-depressivo em roedores. O ensaio é realizado num cilindro com água até um nível que impossibilite os animais de tocarem no fundo do cilindro. Os animais são expostos ao cilindro com água durante 15 minutos (sessão de treino) e 24h horas após os animais são expostos novamente ao cilindro com água, durante 5 min, para a sessão de teste. Dois tipos de atividade comportamental são quantificados durante o teste: a natação (tentativas vigorosas para escapar) e a imobilidade (tempo em que o animal fica flutuando na água, sem a intenção de escapar). A duração da imobilidade define a magnitude do comportamento tipo-depressivo nos animais e pode ser reduzida pelo uso de fármacos antidepressivos. (Adaptado de Kuteeva et al., 2010).

Outro parâmetro comportamental que também pode ser facilmente avaliado em animais experimentais é o comportamento tipo-anedônico. De acordo com o DSM-IV-TR, um dos principais sintomas de depressão é anedonia, que é a perda de interesse ou prazer em realizar atividades diárias (American Psychiatric Association, 2002). Em ratos e camundongos, o comportamento tipo-anedônico é comumente avaliado através da ingestão de sacarose. Assim, uma redução no consumo de líquidos ou comidas palatáveis, em animais experimentais, representa o sintoma de anedonia observado em humanos (Gamaro et al., 2003).

Em modelos experimentais de depressão, podemos avaliar também alterações fisiológicas, como por exemplo, alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). É bem descrito na literatura que a exposição ao estresse leva a ativação do eixo HPA em mamíferos. Em resposta ao estresse, diversos neurotransmissores, incluindo norepinefrina, acetilcolina e GABA, regulam a secreção do fator de liberação da corticotrofina (CRF), o qual é liberado a partir de células do hipotálamo. CRF controla a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na pituitária e liberado na corrente sanguínea. O ACTH, por sua vez, age sobre a glândula adrenal para aumentar a secreção de cortisol e outros glicocorticóides, os quais possuem um

papel fundamental na resistência ao estresse. O cortisol também pode agir inibindo a secreção do CRF, resultando em *feedback* negativo da secreção do ACTH (Cowen, 2002) (**Figura 2**).

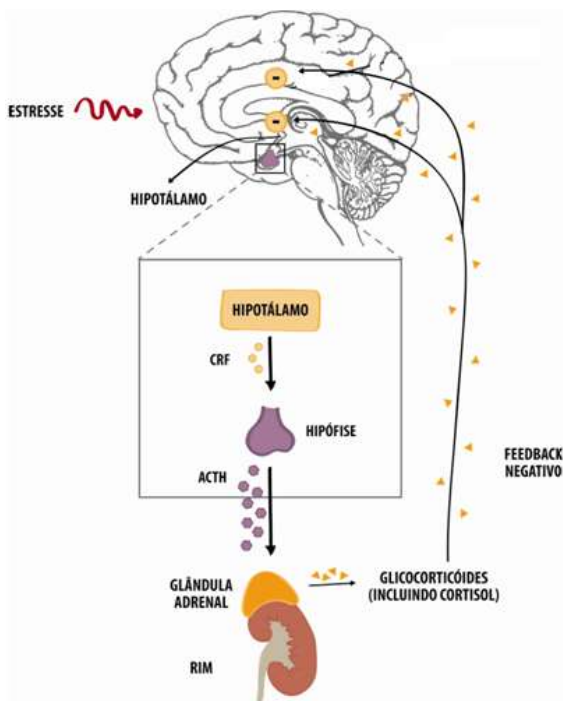


Figura 2. Desenho esquemático do eixo HPA. A figura representa a resposta normal ao estresse do nosso organismo. Essa resposta inclui a ativação do hipotálamo, o qual inicia a cascata de eventos pela liberação de CRF. CRF age sobre a hipófise e induz a liberação de ACTH. O ACTH, por sua vez, induz a liberação de glicocorticóides, como o cortisol, aumentando a resistência do organismo ao estresse. O cortisol também pode agir inibindo a secreção do CRF, resultando em *feedback* negativo da secreção do ACTH. Fonte: Do autor.

Pacientes depressivos possuem níveis elevados de cortisol no sangue em resposta a excessiva liberação de ACTH. Tem sido demonstrado também um aumento tanto da pituitária quanto da adrenal de pacientes com depressão, em função da hipersecreção de ACTH e cortisol (Dinan, 1994). Animais expostos à modelos animais de depressão, induzidos pelo estresse crônico variado ou pela separação materna, também apresentam níveis elevados de ACTH e cortisol no sangue (Suárez et al., 2002; Garcia et al., 2009). Juntos esses estudos

sugerem que a ativação do eixo HPA é uma alteração fisiológica importante, vistas em pacientes com depressão, podendo também ser utilizado para a avaliação de parâmetros tipo-depressivos em modelos animais de depressão.

O teste de campo aberto foi desenvolvido por Hall e Ballachey em 1932 e ainda nos dias atuais é um teste extremamente utilizado para avaliar a atividade exploratória e locomotora em roedores (Hall e Ballachey, 1932). Alterações comportamentais induzidas por psicoestimulantes têm sido amplamente utilizado como um modelo animal de mania, porque induzem agitação psicomotora, que é frequentemente observada durante episódios de mania, além disso, a atividade locomotora é facilmente mensurada em ratos e camundongos utilizando o teste de campo aberto (Davies et al., 1974; Berggren et al., 1978; Gould et al., 2001). Outros testes comportamentais como a avaliação da atividade sexual e a agressividade, também são usados para avaliar parâmetros comportamentais tipo-maníaco em roedores (Einat, 2006).

É importante mencionar que nenhum modelo animal desenvolvido, até o presente momento, pode reproduzir totalmente um determinado transtorno psiquiátrico. No entanto, tradicionais e novos modelos animais promissores, que mimetizam certos atributos de depressão ou mania, estão bem estabelecidos e vem sendo utilizados para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dos transtornos do humor.

1.6 ALTERAÇÕES DA $Na^+K^+ATPase$ NO TRANSTORNO BIPOLAR

Embora a base neurobiológica do TB permaneça desconhecida, disfunções na regulação de íons têm sido identificadas em pacientes bipolares. Dubovsky e colegas (1994) demonstraram concentrações elevadas de íons de cálcio em plaquetas e em linfócitos de pacientes com mania e depressão bipolar. Adicionalmente, estudos têm sugerido que mania e depressão bipolar estão relacionadas com aumento intracelular de Na^+ (Coppen et al., 1966; Shaw, 1966). Juntos, estes estudos sugerem que a diminuição do transporte de íons através da membrana pode estar envolvida neste transtorno.

A $Na^+K^+ATPase$ é uma enzima eletrogênica, transmembrana, ativada por energia química através da adenosina trifosfatase (ATP), e tem como função primária a regulação dos níveis de sódio e potássio intracelulares, a fim de manter o potencial de membrana (Jorgensen et

al., 2003). A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é formada por subunidades α e β (Jorgensen e Andersen, 1988), sendo que o Na^+ se liga a subunidade α - a qual tem três sítios de ligação para o Na^+ - enquanto uma alteração conformacional da subunidade β gera um sítio de ligação ativo para o ATP. Então, o ATP é hidrolisado, dando origem ao ADP e a molécula de fosfato restante se liga a subunidade β , resultando em energia que é usada para bombear Na^+ para o interior da célula. Após, dois íons K^+ se ligam a subunidade β e a molécula de fosfato é liberada, retornando a sua forma de ATP. Assim, a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ transporta três íons de Na^+ para fora e dois íons de K^+ para dentro da célula (Caldwell, 1960) (**Figura 3**).

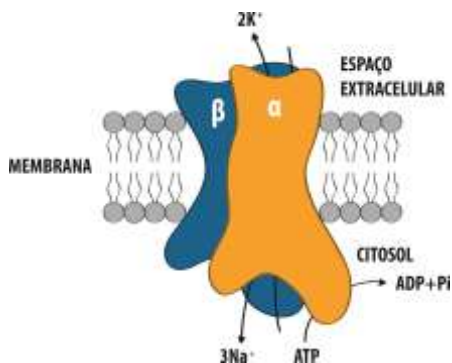


Figura 3. Desenho esquemático da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. A enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ tem como função primária a regulação dos níveis de Na^+ e K^+ intracelulares, a fim de manter o potencial de membrana. Isto requer um significativo gasto de energia (ATP) para movimentar os íons contra o gradiente de concentração. Fonte: Do autor.

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

Contudo, diversos pesquisadores da área tem demonstrado que as bases biológicas do TB parece ser um quadro complexo, envolvendo também plasticidade neuronal, vias de transcrição de sinal, regulação da expressão gênica, metabolismo energético celular, estresse oxidativo, entre outros (Kapczinski et al., 2008a; Steckert et al., 2010; Berk et al., 2011).

1.7 O ESTRESSE OXIDATIVO NO TRANSTORNO BIPOLAR

Uma grande quantidade de estudos, tanto clínicos quanto pré-clínicos, tem fortemente sugerido o envolvimento do estresse oxidativo no TB (Frey et al., 2006a; Halliwell, 2006; Andreazza et al., 2009; Berk et al., 2011; Jornada et al., 2011). A disfunção mitocondrial, com consequente prejuízo no metabolismo energético celular, tem sido descrita como principal desencadeador desse sistema (Kato, 2007). Um estado energético celular anormal pode levar à perda da função e da plasticidade neuronal e, conseqüentemente, a alterações cognitivas e comportamentais características do TB (Steckert et al., 2010).

As mitocôndrias são organelas intracelulares que possuem um papel fundamental na produção de adenosina trifosfato (ATP), através da fosforilação oxidativa. Os neurônios, assim como os músculos, apresentam membrana excitável, a qual permite a entrada de íons do meio extracelular por uma grande variedade de canais. Assim, o neurônio requer grande quantidade de energia para manter o equilíbrio intracelular de íons contra o gradiente de concentração, sendo que os processos via $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ situadas na membrana são os que mais gastam energia em células excitáveis (Nicholls e Budd, 2000).

Embora a fosforilação oxidativa seja fundamental para a formação de ATP, um componente vital do metabolismo, produz também espécies reativas de oxigênio (ERO), especialmente nos complexos I e III (Green et al., 2004) (**Figura 4**).

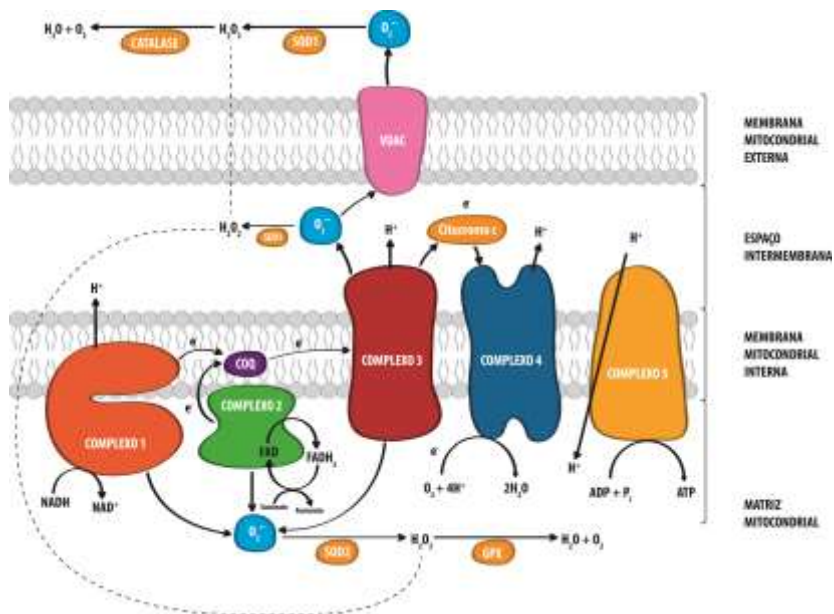


Figura 4. Desenho esquemático da formação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) durante a fosforilação oxidativa. Além disso, a figura demonstra a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) 1, SOD 2, glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A SOD 2 age sobre a molécula de $O_2^{\cdot-}$ na matriz mitocondrial, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto que a GPx age sobre o H_2O_2 , produzindo H_2O e O_2 . A SOD1 age sobre o $O_2^{\cdot-}$ produzindo H_2O_2 no espaço intermembrana e no citosol. A CAT age sobre o H_2O_2 no citosol, produzindo H_2O e O_2 . O $O_2^{\cdot-}$ pode atravessar a membrana externa mitocondrial através de um canal iônico dependente de voltagem (VADC) e o H_2O_2 tem livre acesso as membranas mitocondriais, como pode ser observado pelas linhas pontilhadas do desenho. Fonte: Do autor.

Em situações em que a produção de ERO excede a capacidade de defesa antioxidante, uma condição chamada de estresse oxidativo, torna as biomoléculas vulneráveis a danos, podendo levar a célula a apoptose (Cochrane, 1991). Entre as EROs encontram-se: o oxigênio *singlet* (1O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Yu, 1994; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Algumas das EROs são radicais livres, enquanto outras são agentes oxidantes não radicalares, como por exemplo, o H_2O_2 . Dentre as EROs, $oO_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$ são classificados como radicais livres de oxigênio porque apresentam um elétron desemparelhado em sua estrutura atômica. Os radicais livres, por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, são as espécies mais reativas (Halliwell e Gutteridge, 1989). O radical $\cdot OH$ é a ERO mais potente e, conseqüentemente, é o que causa maior dano nos

sistemas biológicos, devido ao seu tempo de vida extremamente curto (1×10^{-9} s) e de sua alta reatividade com uma grande variedade de moléculas orgânicas (Yu, 1994). Além de ser produzido durante a fosforilação oxidativa, o radical $\cdot\text{OH}$ pode, ainda, ser formado por duas diferentes vias alternativas em organismos vivos, pela reação de Fenton e pela reação de Haber-Weiss (Haber e Weiss, 1934; Halliwell e Gutteridge, 1990), como demonstrado na **Figura 5**:

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Figura 5. Reação de Fenton e reação de Haber-Weiss. A reação de Fenton é o nome dado à oxidação de Fe^{3+} a Fe^{2+} pelo H_2O_2 , uma reação que produz espécies com alto poder oxidante como o OH^\cdot . Outra reação que gera o radical OH^\cdot é a reação de Haber-Weiss, que é catalisada por metais de transição como o Ferro e o Cobre. (Adaptado de Resende et al., 2003).

Para se proteger contra os efeitos deletérios das EROs, a célula possui uma série de defesas antioxidantes capazes de agir sobre essas substâncias tóxicas. Esse sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático, e ambos trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das EROs nos tecidos. O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutationa peroxidase (GPx), a glutationa redutase (GR) e a glutationa S-transferase (GST) (Chance et al., 1979; Yu, 1994). A SOD converte $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , o qual é subsequentemente reduzido a H_2O pela CAT. A GPx também converte H_2O_2 a H_2O , oxidando a glutationa reduzida (GSH) ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). A GSH é regenerada pela GSR por intermédio da oxidação de NADPH (Imai e Nakagawa, 2003).

Essas substâncias citotóxicas podem também ser originadas através de reações enzimáticas, de reações de auto-oxidação ou ainda pelo grupo heme de algumas proteínas. Cerca de 1-2% do oxigênio consumido durante a fosforilação oxidativa é convertido em $\text{O}_2^{\cdot-}$,

quando elétrons são liberados da cadeia de transporte de elétrons e são acidentalmente transferidos para o oxigênio molecular (Orrenius et al., 2007). No entanto, sob condições metabólicas ou de estresse específicos, uma quantidade ainda maior de elétrons podem ser liberados da cadeia respiratória, aumentando ainda mais a geração de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial. Esta liberação acidental de elétrons ocorre nos complexos I, II ou III, embora os complexos I e III sejam os maiores sítios de produção de $O_2^{\cdot-}$ dentro da mitocôndria (Orrenius et al., 2007; Koopman et al., 2010).

O $O_2^{\cdot-}$ pode atravessar a membrana mitocondrial externa através de um canal iônico dependente de voltagem (VDAC). A molécula de $O_2^{\cdot-}$ pode também ser convertida a H_2O_2 na matriz mitocondrial pela SOD2 ou no espaço intermembrana pela SOD1 (Han et al., 2003). O H_2O_2 podem atravessar livremente as membranas mitocondriais ou pode sofrer a ação da enzima antioxidante GPx, sendo transformado em H_2O e O_2 . No citosol, $O_2^{\cdot-}$ é também convertido a H_2O_2 pela SOD1, que por sua vez será transformado em H_2O e O_2 pela ação da enzima CAT (**Figura 4**).

Além das EROs, existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que tem como principais representantes o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Sakar e Bhaduri, 2001; Bowler e Crapo, 2002). A interação do NO^{\cdot} com o $O_2^{\cdot-}$ produz o $ONOO^{\cdot}$, o qual é capaz de se decompor produzindo potentes oxidantes em pH fisiológico. Ao contrário da maioria das EROs e a exemplo do radical OH^{\cdot} , o NO^{\cdot} , bem como o $ONOO^{\cdot}$, não possuem uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações reguladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos e, principalmente, pelas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ disponíveis (Rao et al., 1992; Kooy et al., 1997).

Marcadores de estresse oxidativo têm sido amplamente utilizados para o estudo do papel desse sistema nos transtornos psiquiátricos, como por exemplo: quantificação de hidroperóxidos de lipídeo (LPH), níveis de malondialdeído (MDA), de 4-hidroxinonal (4-HNE), de 8-Isoprostano (8-ISO), de proteínas carboniladas e de 3-nitrotirosina (Andreazza et al., 2009; 2013; Gubert et al., 2013). Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o MDA e 4-HNE. O dano a proteínas também pode ocorrer pelo ataque direto de ERO à sua estrutura, ou através de moléculas originadas de processos de oxidação, como por exemplo, o MDA e 4-HNE (Halliwell e Gutteridge, 2007). Dentre os isoprostanos, o 8-ISO é um composto do tipo prostaglandina, da família F_2 -isoprostanos, e também é produzido pela peroxidação

lipídica, derivado principalmente a partir da oxidação do ácido araquidônico (Moore e Roberts, 1998).

A formação de carbonilas representa um marcador precoce da oxidação de proteínas. Esse processo envolve cátions do ciclo redox como o ferro e o cobre, os quais possuem locais de ligação à proteínas, podendo transformar resíduos de aminoácidos em carbonilas na presença de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. Os aminoácidos lisina, arginina, prolina e histidina são os mais propensos a gerar carbonilas (Descamps-Latscha e Witko-Sarsat, 2001; Descamps-Latscha et al., 2001). Outra forma de dano oxidativo as proteínas ocorre através da nitração da tirosina induzida por $ONOO^{\cdot}$, formando assim 3-nitrotirosina (Beckman e Koppenol 1996; Naoi et al., 2005). Os danos induzidos pela nitração da tirosina, embora significativos, são menos agressivos quando comparados com os danos provocados pela carbonilação de proteínas (Irie et al., 2003; Osoata et al., 2009).

Diversos estudos clínicos encontraram níveis elevados de MDA e de grupamentos carbonila no sangue de pacientes com TB, quando comparado com controles saudáveis (Andreazza et al., 2009; Kapczinski et al., 2011; Pedrini et al., 2012). Estudos *postmortem* têm demonstrado que no córtex pré-frontal de pacientes bipolares apresentam níveis elevados de grupamentos carbonila, 3-nitrotirosina, 4-HNE e 8-ISO (Wang et al., 2009; Andreazza et al., 2010; 2013). Além disso, o sistema de defesa antioxidante também parece estar alterado no TB, até mesmo em estágios iniciais do transtorno. Andreazza e colegas (2009) evidenciaram um aumento de glutatona, tanto de GST quanto de GSR, no sangue de bipolares em estágios iniciais do transtorno. A enzima antioxidante SOD também foi encontrada aumentada no sangue de pacientes bipolares, durante episódios de mania e de depressão (Kunz et al., 2008).

Outro ponto a ser ressaltado é o envolvimento dos fatores neurotróficos com o estresse oxidativo. Estudos tem demonstrado que o estresse oxidativo pode estar aumentado em situações em que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) está diminuído em pacientes bipolares (Kapczinski et al, 2008a; Kapczinski et al, 2008b), indicando uma associação entre o BDNF e o estresse oxidativo no TB. Além disso, estudos pré-clínicos mostraram que os estabilizadores do humor, Li e VPA, são capazes de aumentar os níveis de BDNF e proteger o cérebro de ratos contra danos oxidativo (Jornada et al, 2010; Jornada et al., 2011).

Tendo em vista a redução da densidade neuronal e glial observadas no pré-frontal e no hipocampo de pacientes bipolares (Ongür

et al., 1998; Liu et al., 2007; Vostrikov et al., 2007), podemos sugerir que o comprometimento dessas estruturas cerebrais estão ligados as alterações cognitivas e comportamentais características do TB. Um corpo crescente de dados indicam que alterações em vias de sinalização do BDNF e o aumento de estresse oxidativo podem ser os fatores chave ligados a morte celular vista no cérebro de pacientes bipolares e, conseqüentemente, uma possível explicação para a fisiopatologia do TB (Carter et al., 2007; Kapczinski et al., 2008a; Kapczinski et al., 2008b; 2011).

1.8 O PAPEL DO BDNF NO TRANSTORNO BIPOLAR

O grande interesse sobre o BDNF, e outras neurotrofinas, no TB iniciou a partir da descoberta de que antidepressivos e estabilizadores do humor poderiam agir sobre essas moléculas, modulando suas vias de sinalização (Duman e Monteggia, 2006; Banasr e Duman, 2008). Estudos pré-clínicos, demonstraram que o uso crônico de antidepressivos e de estabilizadores do humor, como o Li e o VPA, são capazes de aumentar os níveis de BDNF no córtex frontal e no hipocampo de ratos (Frey et al., 2006b; Banasr e Duman, 2008; Jornada et al., 2010).

As neurotrofinas são produzidas como pro-isoformas, as quais são clivadas e liberadas na sua forma madura e, uma vez secretadas, podem se ligar e ativar seus respectivos receptores e, assim, promover a sobrevivência e crescimento neuronal. O BDNF existe nas formas pró-BDNF e BDNF maduro; entretanto, o papel fisiológico da pró-isoforma dessa neurotrofina tem sido controverso (Matsumoto et al., 2008; Yang et al., 2009). Em um prévio estudo, publicado na *Nature Neuroscience*, Matsumoto e colaboradores (2008) tem sugerido que o pró-BDNF é um intermediário sintético transitório que provavelmente não é secretado e que não possui um papel fisiológico como um ligante extracelular. Por outro lado, outro estudo demonstra que pró-BDNF é secretado e que possui a capacidade de funcionar como um ligante, regulando, também nessa conformação, a função neuronal (Yang et al., 2009).

As neurotrofinas desempenham um papel importante na sobrevivência neuronal, na plasticidade sináptica e nas funções cognitivas. Os membros dessa família incluem o BDNF, o fator neurotrófico de crescimento neuronal (NGF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4 (NT-4). As neurotrofinas se ligam e ativam uma família específica de receptores de tirosina quinase (TrK), promovendo assim uma importante modulação do sistema nervoso central (SNC). Existem

três receptores específicos de Trk, o TrkA se liga ao NGF, o TrkB se ao BDNF e a NT-4 e, finalmente, o TrkC que se liga a NT-3 (Kalb, 2005). A ligação das neurotrofinas ao seu receptor induz a dimerização e autofosforilação de resíduos específicos de tirosina quinase no seu domínio citoplasmático que, por sua vez, irá ativar uma via de sinalização intracelular (Kaplan e Miller, 2000).

É bem descrito na literatura que a ligação de BDNF ao seu receptor ativa várias vias de sinalização intracelular, modulando a morfologia, a sobrevivência e a plasticidade neuronal. Entre as vias de sinalização implicadas nos efeitos neurotrófico de BDNF incluem: proteína quinase ativada por mitógeno/proteína quinase regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK), fosfolipase Cy (PLCy) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Além disso, pequenas proteínas G como a Ras e a Rap-1 tem também sido implicadas nos efeitos desencadeados pelo complexo BDNF/TrkB (Berridge e Irvine, 1989; Hetman et al., 1999; Wu e Pardridge, 1999; Schäbitz et al., 2000; Schlessinger, 2000). Estudos tem demonstrado que a ligação BDNF/TrkB previne a morte celular por ativar as vias de sinalização PI3K e ERK, através da inibição da glicogênio sintase kinase-3 (GSK-3) e, conseqüentemente, ativação da proteína de ligação ao AMPc - elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina - (CREB). O CREB é um importante fator de transcrição que ativa a expressão de genes essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios (Hetman et al., 1999; Xia et al., 2010).

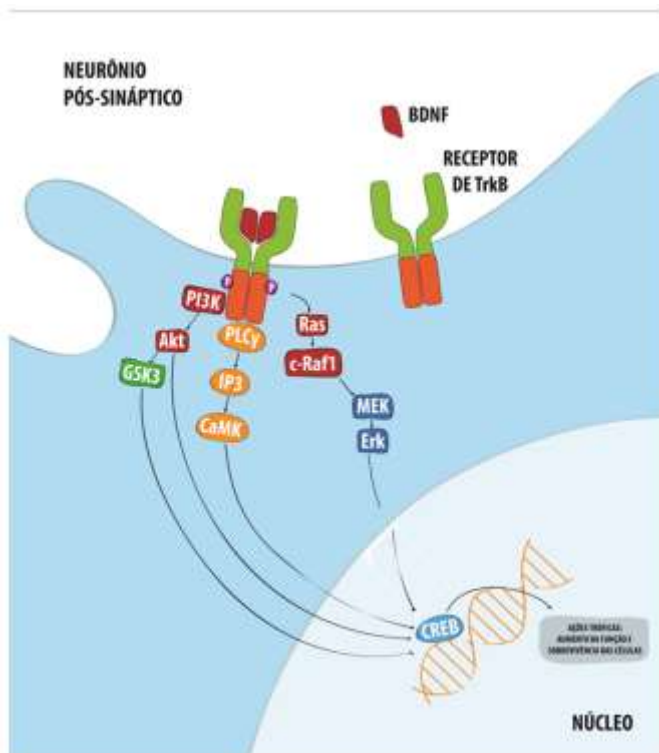


Figura 6. Vias de sinalização ativadas pelo complexo BDNF/TrkB. As vias de sinalização implicadas nos efeitos neurotrófico de BDNF são: proteína quinase ativada por mitógeno/proteína quinase regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK), fosfolipase Cy (PLCγ) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Além disso, pequenas proteínas G como a Ras e a Rap-1 tem também sido implicadas nos efeitos de BDNF/TrkB. A sinalização de todas essas vias irá ativar CREB, o qual é um importante fator de transcrição que induz a expressão de importantes proteínas neuroprotetoras e com ações tróficas no neurônio. Fonte: Do autor.

Tendo em vista que as neurotrofinas são essenciais para o funcionamento e sobrevivência neuronal, supõe-se que a viabilidade das células nervosas pode ser afetada por uma redução persistente dessas moléculas no SNC (Manji e Chen, 2000). Diversos estudos tem demonstrado uma diminuição dos níveis de BDNF e do seu receptor, TrkB, tanto no sangue quanto no cérebro de pacientes bipolares (de Oliveirael al., 2009; Kapczinski et al., 2009; Soontornniyomkij et al., 2011; Thompson Ray et al., 2011; Huang et al., 2012). Além disso, um polimorfismo do gene do BDNF, que substitui uma valina por uma

metionina no códon 66 (Val66Met) tem sido associado com a fisiopatologia do TB (Craddock et al., 2005).

1.9 JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO

Levando em consideração a falta de conhecimento sobre a precisa fisiopatologia do TB, que consequentemente prejudica o desenvolvimento de novos fármacos para essa condição, mais estudos para a investigação de novos sistemas intracelulares envolvidos no TB são necessários. A criação de um modelo animal de TB é um desafio, pois este transtorno apresenta uma complexa evolução que altera o curso clínico, variando entre episódios de mania e depressão. Por isso, se faz necessário o desenvolvimento de um modelo animal de TB que mimetize de maneira mais completa o ciclo maníaco-depressivo do transtorno tal como ocorre em humanos, podendo assim facilitar o estudo dessa patologia e aperfeiçoar o desenvolvimento e o teste de novos compostos farmacológicos. Os modelos animais existentes focam na indução de comportamentos que mimetizam a mania ou a depressão, separadamente. Nenhum estudo, até o momento, descreveu os dois tipos de comportamento, tipo-maníaco e tipo-depressivo, em um mesmo animal experimental, dificultando o desenvolvimento de um modelo animal de TB adequado. Por isso, se fazem necessários mais testes para a validação do modelo animal de TB induzido por ouabaína. Do mesmo modo, são também necessárias análises bioquímicas nesse modelo a fim de reproduzir os achados neurobiológicos já descritos em outros modelos, tanto de depressão quanto de mania, e identificar fenômenos não detectados nesses modelos, mas presentes nos pacientes com TB. Tendo em vista que o papel do estresse oxidativo e das alterações na via de sinalização do BDNF tem sido bem descritos no TB, a avaliação de ambos os sistemas é de extrema importância para a consolidação de um modelo animal de TB.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Consolidar um modelo animal de TB induzido pela administração i.c.v de ouabaína em ratos *Wistar*, quanto as validades de face, constructo e preditiva.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade locomotora e exploratória em ratos *Wistar*, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
2. Avaliar comportamentostipo-depressivo, através do teste do nado forçado e do teste de consumo de sacarose, em ratos *Wistar*, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
3. Avaliar parâmetros de alteração do eixo HPA, através da mensuração dos níveis sanguíneos de ACTH e de corticosterona e do peso da glândula adrenal de ratos *Wistar*, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
4. Avaliar a cognição de ratos *Wistar*, através do teste da esQUIVA inibitória e do teste de reconhecimento de objetos, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
5. Avaliar os níveis de pro-BDNF, de BDNF, de TrkB e de CREB no córtex frontal e hipocampo de ratos *Wistar*, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
6. Avaliar os efeitos do Li e do VPA sobre a atividade locomotora de ratos *Wistar*, 7 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
7. Avaliar os efeitos do Li, do VPA e da IMI sobre a atividade locomotora de ratos *Wistar*, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
8. Avaliar os efeitos do Li, do VPA e da IMI sobre os testes do nado forçado e do consumo de sacarose em ratos *Wistar*, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
9. Avaliar os efeitos do Li, do VPA e da IMI sobre os níveis sanguíneos de ACTH e de corticosterona e o peso da glândula adrenal de ratos *Wistar*, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
10. Avaliar os efeitos do Li sobre os parâmetros dano oxidativo a lipídeos, níveis de LPH, de MDA, de 4-HNE e de 8-ISO, no córtex frontal e no hipocampo de ratos *Wistar*, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
11. Avaliar os efeitos do Li sobre os parâmetros de dano oxidativo a proteínas, níveis de grupamentos carbonila e de 3-nitrotirosina, no córtex frontal e no hipocampo de ratos *Wistar*, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.
12. Avaliar os efeitos do Li sobre os níveis de GSH e sobre a atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT, GPx, GSR, no córtex frontal e no hipocampo de ratos *Wistar*, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Este projeto só foi executado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para o Uso de Animais (CEUA) da UNESC, protocolo 66/2010.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, com aproximadamente 60 dias, pesando entre 250 e 300g, procedentes do biotério da UNESC. Os animais foram acondicionados em cinco animais por caixa, com ciclo claro-escuro de 12 horas - das 06h00min às 18h00min claro - e com comida e água a vontade. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 80 mg/kg e xilasina 10 mg/kg intramuscular. No aparelho estereotáxico, foi removida a pele na região craniana do rato. A cânula guia - de 1 mm - foi implantada no ventrículo lateral a partir das seguintes coordenadas: 0,9 mm para trás do bregma, 1,5 mm à direita do bregma e 2,6 mm de profundidade (Paxinos e Watson, 1986). Em seguida, a fixação da cânula guia foi feita com acrílico dental.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

3.4.1 Administração de ouabaína - validação de face do modelo animal de TB

A injeção i.c.v de ouabaína (10^{-3}M em um volume de 5ul) ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCR, em um volume de 5 ul) foram administrados 72 horas após a cirurgia (tempo para a recuperação cirúrgica dos animais).

Testes comportamentais realizados a partir deste desenho experimental:

1) Foram avaliados comportamentos tipo-maníaco nos animais, através do teste do campo aberto (descrito a seguir) 7 e 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR (**Figura 7**).



Figura 7. Esquema mostrando o desenho experimental do teste do campo aberto, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de líquido cefalorraquidiano artificial (LCR) ou ouabaína em ratos, para avaliação de comportamento tipo-maníaco em ratos. N = 8 animais por grupo.

2) Foram avaliados comportamentos tipo-depressivo nos animais, através dos testes do nado forçado (**Figura 8A**) e do consumo de sacarose (**Figura 8B**) (descritos a seguir) 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR.

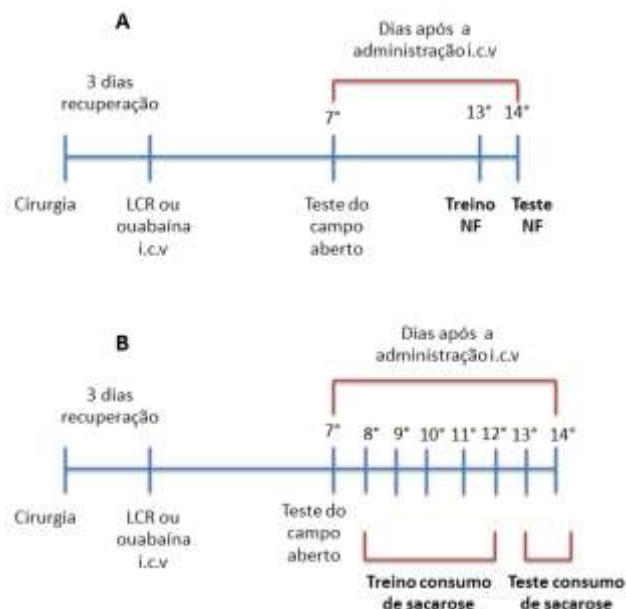


Figura 8. Esquema mostrando o desenho experimental do teste do nado forçado (NF) (**Painel A**) e teste do consumo de sacarose (**Painel B**), 14 dias após a administração i.c.v de líquido

cefalorraquidiano artificial (LCR) ou ouabaína em ratos, para avaliação de comportamento tipo-depressivo em ratos. N= 8 animais por grupo.

3) Foram avaliadas alterações cognitivas nos animais, através dos testes da esQUIVA inibitória (**Figura 9A**) e de reconhecimento de objetos (**Figura 9B**) (descritos a seguir) 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR.

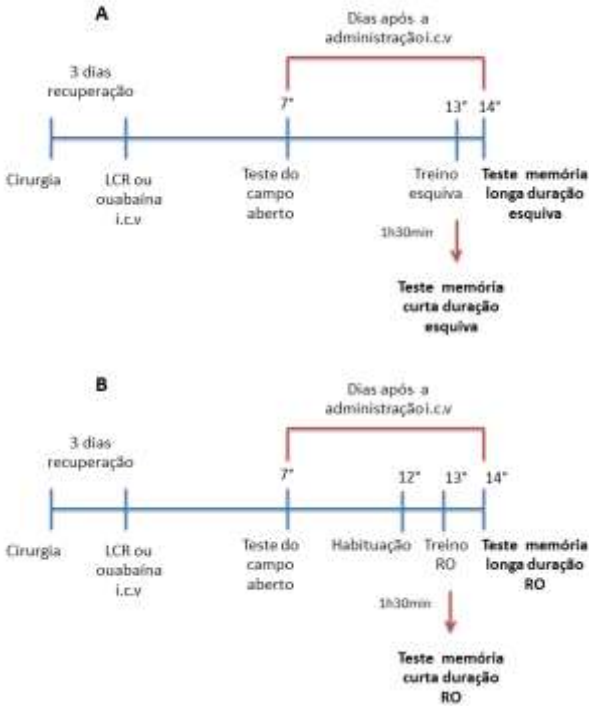


Figura 9. Esquema mostrando o desenho experimental do teste da esQUIVA inibitória (**Painel A**) e teste do reconhecimento de objetos (RO) (**Painel B**), 14 dias após a administração i.c.v de líquido cefalorraquidiano artificial (LCR) ou ouabaína em ratos, para avaliação de alterações cognitivas. N= 8 animais por grupo.

Obs: Foram utilizados grupos independentes de animais para cada teste comportamental.

3.4.2 Avaliação dos efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI em animais submetidos à administração i.c.v de ouabaína em ratos – validação preditiva do modelo.

As injeções i.c.v de ouabaína ou LCR foram administradas 72 horas após a cirurgia. Em seguida, os ratos, que receberam ouabaína ou LCR, foram tratados intraperitonealmente (i.p) com salina (Sal - NaCl 0,9%), Li (47,5 mg/kg; 2 vezes/dia), VPA (200 mg/kg; 2 vezes/dia) IMI (10 mg/kg), a associação de Li+IMI ou VPA+IMI. A administração de Li e VPA começaram imediatamente após a injeção i.c.v e permaneceram durante 13 dias. No entanto, a administração de IMI ocorreu apenas 23h30min e 1h antes dos testes comportamentais. Segue abaixo a lista dos grupos experimentais (n=8) para facilitar o entendimento do leitor:

LCR i.c.v + Sal i.p

Ouabaína i.c.v + Sal i.p

LCR i.c.v + Li i.p

Ouabaína i.c.v + Li i.p

LCR i.c.v + VPA i.p

Ouabaína i.c.v + VPA i.p

LCR i.c.v + IMI i.p

Ouabaína i.c.v + IMI i.p

LCR i.c.v + Li i.p + IMI i.p

Ouabaína i.c.v + Li i.p + IMI i.p

LCR i.c.v + VPA i.p + IMI i.p

Ouabaína i.c.v + VPA i.p + IMI i.p

Algumas informações pertinentes a respeito dos procedimentos durante o tratamento farmacológico são: 1) O intervalo entre a administração dos fármacos foi de aproximadamente 12h. 2) Os ratos que não receberam a associação dos fármacos ou nenhum dos estabilizadores do humor (que são administrados 2 vezes ao dia) receberam uma injeção de veículo equivalente (Sal) no lugar, para que todos os animais fossem submetidos ao mesmo tipo de manipulação.

É importante salientar que as doses dos fármacos utilizados nesse experimento foram baseadas em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Jornada et al., 2010; Abelaira et al., 2011). Como a farmacoterapia usada no tratamento da depressão bipolar é incerta, o antidepressivo IMI foi escolhido por ser inibidor da recaptação de serotonina e por ser um bom controle positivo no teste do nado forçado (Barros e Ferigolo, 1998).

Testes comportamentais realizados a partir deste desenho experimental:

1. Foram avaliados os efeitos do Li e do VPA sobre o comportamento tipo-maniaco induzido por ouabaína nos ratos, através do teste do campo aberto (descrito a seguir) 7 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR (Figura 10).
2. Foram avaliados os efeitos do Li, do VPA e da IMI sobre a atividade locomotora dos animais, através do teste do campo aberto (descrito a seguir) 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR (Figura 10).

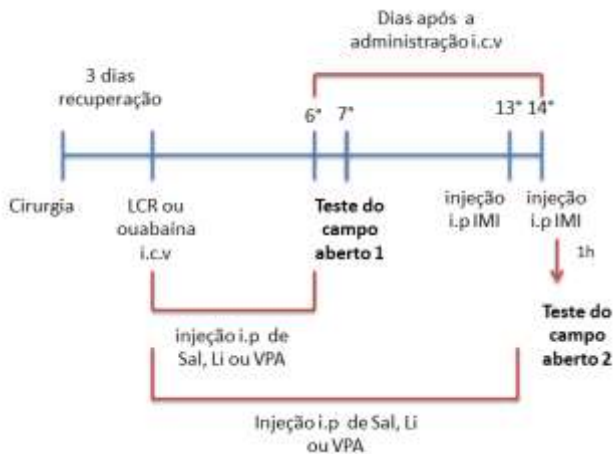


Figura 10. Esquema mostrando o desenho experimental em que foi avaliado os efeito dos estabilizadores do humor, Li e VPA, sobre o teste do campo aberto, 7 e 14 dias após a administração i.c.v de líquido cefalorraquidiano artificial (LCR) ou ouabaína em ratos, para avaliação de comportamento tipo-maniaco em ratos. N = 8 animais por grupo.

3. Foram avaliados os efeitos do Li, do VPA e da IMI sobre comportamento tipo- depressivo induzidos por ouabaína, através dos testes do nado forçado (Figura 11A) e do consumo de sacarose (Figura 11B) (descritos a seguir) 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR.

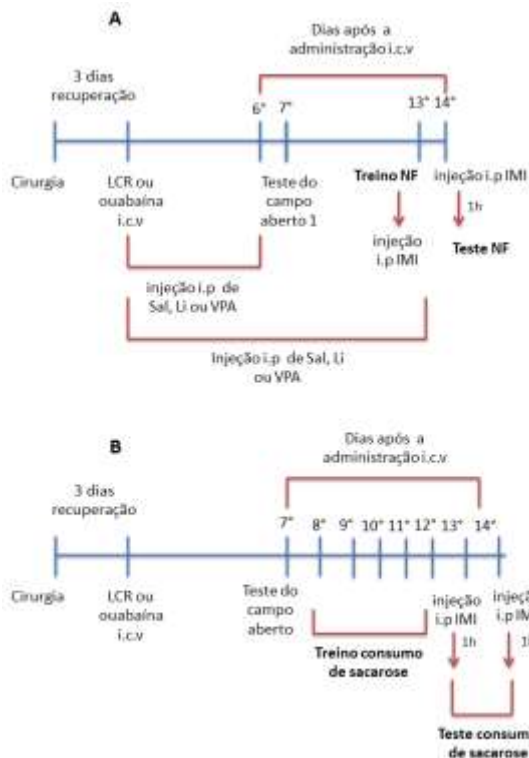


Figura 11. Esquema mostrando o desenho experimental em que foi avaliado os efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre o teste do nado forçado (**Panel A**) e o teste do consumo de sacarose (**Panel B**), 14 dias após a administração i.c.v. de líquido cefalorraquidiano artificial (LCR) ou ouabaina em ratos, para avaliação de comportamentos tipo-depressivo em ratos. N = 8 animais por grupo.

Obs: Foram utilizados grupos independentes de animais para cada teste comportamental.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.5.1 Teste do campo aberto

A atividade locomotora foi mensurada através do teste de campo aberto, executado em uma caixa de 40 x 60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada, com uma parede de vidro frontal e o assoalho com nove retângulos iguais divididos por linhas

pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para que explorassem a arena por 5 minutos. Durante o teste foram contados os cruzamentos entre as linhas pretas, crossings, e a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente, rearings.

Obs: O teste foi realizado 7 ou 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína (**Figura 7**). Os animais dos grupos IMI, Li+IMI ou VPA+IMI receberam uma dose do antidepressivo 23h30mine 1h antes do teste comportamental (**Figura 10**).

3.5.2 Teste do nado forçado

Este teste consiste em dois dias de procedimentos, nos quais cada rato é colocado em um cilindro com água a 23°C, na quantidade suficiente para que o animal não consiga apoiar as patas no fundo. No primeiro dia, sessão de treino, os ratos foram forçados a nadar por 15 minutos. Na sessão de teste, 24 horas após o treino, cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Durante a sessão de teste foi avaliada a imobilidade dos animais (imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar) (Porsolt et al., 1977).

Obs: A sessão de treino foi realizada 13 dias após e a sessão de teste 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína nos ratos (**Figura 8A**). Os animais que foram submetidos ao tratamento farmacológico, receberam suas doses diárias após a sessão de treino. Os animais dos grupos IMI, Li+IMI ou VPA+IMI receberam uma dose do antidepressivo 23h30min e 1h antes do teste comportamental (**Figura 11A**).

3.5.3 Teste do consumo de sacarose

O teste do consumo de sacarose é comumente usado para medir comportamento tipo-anedônico em animais experimentais. Este teste foi executado em uma caixa de 40 x 60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada, com uma parede de vidro frontal e o assoalho com nove retângulos iguais divididos por linhas pretas. Os animais foram submetidos a cinco sessões de treino e duas sessões de teste, uma sessão por dia, com duração de 3 minutos cada. Em todas as sessões foram colocados no centro da caixa dez *Froot Loops*® (cereal de trigo, amido de milho e açúcar). Os ratos foram submetidos ao jejum de 22h durante as sessões de treino para estimular a ingestão do novo alimento. É importante salientar que imediatamente

após a última sessão de treino foi disponibilizado comida a vontade aos animais. As sessões de treino foram realizadas com o intuito de habituar os ratos ao cereal, e durante as duas sessões de teste foram contada a quantidade de cereais ingeridos pelos animais. Um protocolo foi estabelecido de modo que quando o animal comia parte do *Froot Loops* (por exemplo, 1/3 ou 1/4), esta fração foi considerada (Gamaro et al., 2003).

Obs: As sessões de treino iniciaram no 8º dia após a administração i.c.v e a última sessão de teste foi realizada no 14º dia após a administração i.c.v de ouabaína nos ratos (**Figura 8B**). Os animais que foram submetidos ao tratamento farmacológico, receberam suas doses diárias após as sessões de treino. Os animais dos grupos IMI, Li+IMI ou VPA+IMI receberam uma dose do antidepressivo 23h30min 1h antes do teste comportamental (**Figura 11B**).

3.5.4 Teste da esquiiva inibitória

A tarefa de esquiiva inibitória é um dos testes de memória mais utilizados e consiste em inibir a exploração do ambiente pela aplicação de choques no animal. O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma. O aparelho é constituído por uma caixa medindo 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura. Parte do chão é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro) que se distanciam umas das outras por um espaço de 1 cm entre elas. Na parede esquerda do aparelho está inserida uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento.

Na sessão de treino, o animal é colocado sobre a plataforma e mede-se o tempo que ele leva para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado “latência”. Imediatamente após o animal descer da plataforma, recebe um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal é novamente colocado na plataforma e, então, é medido o tempo que ele leva para descer, porém não é administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de formação de memória. No presente estudo foram avaliadas as memórias de curta e longa duração, por isso, os animais foram submetidos a duas seções de teste. Os intervalos entre o treino e os testes foram de 1h e 30min, para avaliação da memória de curta duração, e 24 horas, para avaliação da memória de longa duração (Izquierdo e Medina, 1997) (**Figura 12**).

Obs: O treino e a avaliação da memória de curta duração foram realizados 13 dias após a administração de ouabaína ou LCR e a avaliação da memória de longa duração 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR nos ratos (**Figura 9A**).

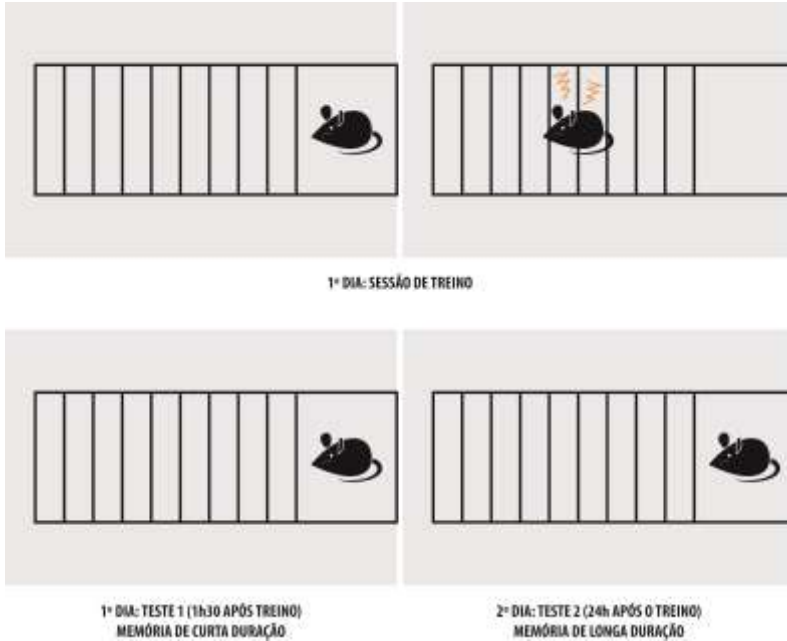


Figura 12. Ilustração do teste da esquiva inibitória. Na sessão de treino, o animal é colocado sobre a plataforma e mede-se o tempo que ele leva para descer com as quatro patas da plataforma. Imediatamente após o animal descer da plataforma, recebe um choque. Na sessão de teste, o animal é novamente colocado na plataforma e, então, é medido o tempo que ele leva para descer, porém não é administrado choque. A memória de curta duração é avaliada 1h30min após o treino e a memória de longa duração é avaliada 24h após o treino. Fonte: Do autor.

3.5.5 Teste do reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no campo aberto (descrito no item 3.3.1). Esse teste é muito usado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos, novos, e já conhecidos. No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, considerado o dia da habituação, cada rato foi colocado individualmente no canto superior

esquerdo da caixa, e deixado por 5 minutos, sem nenhum objeto na caixa, para que se habitue ao ambiente.

Após 24 horas, na sessão treino, o animal foi recolocado no campo aberto, com dois objetos exatamente iguais A1 e A2 de brinquedo de Lego duplo, exatamente no meio da caixa, paralelos e deixados por 5 minutos para que os animais explorem o ambiente livremente. O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado e posterior analisado através do índice de reconhecimento. No mesmo dia em 1h e 30min após a sessão teste, para a avaliação da memória de curta duração, o animal foi recolocado na caixa com dois objetos (A1 e B1) que eram semelhantes na cor e tamanho, porém de formas diferentes. Nessa sessão, os animais foram deixados durante 5 minutos para explorar os objetos. Para testar a memória de longa duração o animal foi recolocado na caixa, 24 horas após a sessão treino, com dois objetos, um que ele já está familiarizado, o objeto A1, e outro objeto totalmente distinto, o objeto C1, de todos os outros, de cor, forma e tamanhos diferentes. Nessa sessão, os animais tiveram também 5 minutos para explorar o novo objeto (Rossato et al., 2007) (**Figura 13**).

Para a análise dos resultados foi usado o índice de reconhecimento que é calculado pela fórmula $TB1 / (TA1 + T1B)$ onde TA é o tempo gasto para explorar um objeto família, que já é conhecido do animal, e TB é o tempo gasto para explorar o novo objeto.

Obs: O treino e a avaliação da memória de curta duração foram realizados 13 dias após a administração de ouabaína ou LCR e a avaliação da memória de longa duração 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína ou LCR nos ratos (**Figura 9B**).

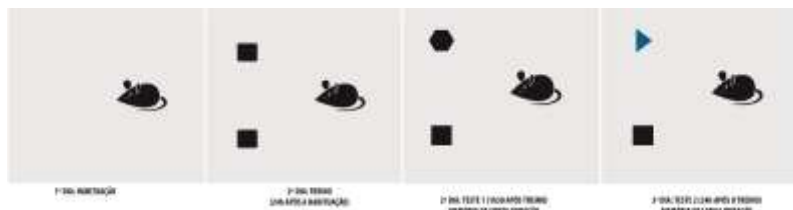


Figura 13. Ilustração do teste de reconhecimento de objetos. No primeiro dia o animal é colocado na caixa em que será realizado o teste. No segundo dia, a sessão de treino, é colocado 2 objetos iguais na caixa para que o animal explore durante 5 minutos. Para a avaliação da memória de curta duração, 1h30min após a sessão de treino, é colocado na caixa dois objetos de formatos diferentes, mas, com cores iguais, para que os animais explorem durante 5 min. Para a avaliação da memória de longa duração, 24 h após a sessão de treino, é colocado na caixa dois objetos de formatos diferentes e de cores diferentes e deixado os animais explorar durante 5 min. Fonte: Do autor.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Punção cardíaca e extração da adrenal

Após o término dos testes comportamentais, foi administrado nos animais cloridrato de cetamina 80 mg/kg e xilasina 10 mg/kg intramuscular para a retirada de sangue por punção cardíaca, através de seringa heparinizada. A seguir, foi isolado o soro a partir do sangue dos animais para a avaliação dos níveis de ACTH e corticosterona.

Além disso, a glândula adrenal foi extraída e o seu peso foi mensurado, através de uma balança de precisão.

3.6.2 Preparo das amostras cerebrais

Após a punção cardíaca os ratos foram decapitados em guilhotina, os cérebros foram removidos e dissecados em córtex frontal e hipocampo. As amostras foram dissecadas em uma superfície gelada, posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas no *ultra freezer* a -70°C para posterior análise bioquímica.

3.6.3 Análise dos níveis de ACTH e corticosterona

Os níveis de ACTH e de corticosterona foram medidos através de radioimunoensaios utilizando o MP Biomedicals Kit sendo os resultados expressos em ng/ml. Ambas as análises foram realizadas por um laboratório comercial (Biolabor - Laboratório de Análises Clínicas, Sorocaba, SP Brasil), o qual era cego para as condições experimentais.

3.6.4 Avaliação de pró-BDNF, BDNF e CREB, através de Western Blot

A partir das estruturas dissecadas, descritas anteriormente, foram preparados alíquotas contendo 70 μg de proteína, por amostra, as quais foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 1,5 mm de espessura. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento e 120 volts até o final do gel de resolução. Na sequência, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da Bio

Rad, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas com anticorpos específicos sob agitação constante por uma noite a 4°C; a saber: pró-BDNF (1:1000), BDNF (1:1000), TrkB (1:1000), pCREB (ser133) (1:1000), tCREB (1:1000) e β -actina (1:1000). Então, foram lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas a seguir em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo secundário (anti-coelho, anti-camundongo ou anti-cabra) foi adicionado de acordo com a especificação do anticorpo primário. O excesso do secundário foi lavado com solução basal e então, as membranas foram incubadas por dois minutos em substrato enzimático e expostas ao foto revelador da BioRad. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das imagens detectadas pelo foto revelador, utilizando o programa Image Lab para a quantificação. A quantificação de proteínas foi feita através do método de Lowry (Peterson, 1977).

3.6.5 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

3.6.5.1 Peroxidação lipídica

Foram analisadas quatro medidas distintas de peroxidação lipídica: LPH (Cayman, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA, item No. 705003), TBARS (Cayman, item No. 10009055), 4-HNE (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, EUA; STA-338), e 8-ISO (Cayman; item No. 516351), seguindo instruções do fabricante.

LPH: A LPH foi isolada a partir 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 absorvância de 500nm. A absorvância foi comparada com uma curva padrão de hidroperóxido para determinar a quantidade de peroxidação lipídica nas amostras. A LPH foi quantificada em nmol.

TBARS: O kit de TBARS da Cayman permite a quantificação da peroxidação lipídica, através da ligação do TBA ao MDA. O aduto formado pela ligação TBA-MDA em altas temperaturas (90- 100°C) e em condições ácidas foi mensurado colorimetricamente a 530-540 nm.

Foram calculados os valores os valores de MDA para cada amostra a partir de uma curva padrão.

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).

8-ISO: 8-ISO foi quantificado usando um kit para ELISA do tipo competitivo. Este teste é baseado na competição entre 8-ISO (analito) e 8-ISO-acetilcolinesterase (8-ISO-AChE) conjugado (analito marcado), por um número limitado de sítios de união (antissoro específico para 8-ISO). Como o 8-ISO e o 8-ISO-AChE competem por um número limitado de ligação ao antissoro, a intensidade da cor induzida pela ligação do analito marcado é inversamente proporcional à quantidade de 8-ISO. Por isso, foi realizado um ajuste da curva através de um modelo logístico de quatro parâmetros para a determinação da concentração real de 8-ISO. O 8-ISO foi quantificado em pg/ml.

3.6.5.2 Oxidação e nitração proteica

Carbonilação de proteínas: O dano oxidativo a proteínas foi analisado através da mensuração da quantidade de proteína carbonila presentes na amostra, através de um kit ELISA de imunodeteção (OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit - STA-310). A quantidade de grupamentos carbonila presentes na amostra foi determinada pela comparação da absorbância, a 450 nm, da amostra com a de uma curva padrão.

Nitração de proteínas: A nitração de proteínas foi analisada através de um kit ELISA (OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit, STA-305, Cell Biolabs, Inc., San Diego, EUA), competitivo, para a quantificação de nitrotirosina. Após uma breve incubação da amostra em uma placa, um anticorpo anti-nitrotirosina é adicionado, seguido por um anticorpo secundário conjugado com HRP. A quantidade de nitrotirosina presente na amostra foi determinada pela comparação com uma curva padrão.

3.6.5.3 Atividade das enzimas antioxidantes

SOD: a atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina e mensurada espectrofotometricamente, conforme previamente descrito por Bannister e Calabrese (1987).

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

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

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

3.7 Análises Estatísticas

Todos os gráficos representam média±desvio padrão da média, exceto os gráficos da latência no teste da esquiua inibitória que estão representados como mediana e intervalo interquartil. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T para amostras independentes ou pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. Para os dados obtidos a partir da esquiua inibitória as diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de Mann–Whitney e as diferenças entre treino e teste foram analisadas pelo teste de Wilcoxon. No teste de reconhecimento de objetos os dados foram analisados pela ANOVA de medidas repetidas. Em todas as comparações, a significância estatística foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Como podemos observar na **Figura 14**, a administração i.c.v de ouabaína nos ratos aumentou a atividade locomotora, crossings ($t = 10,4$; $df = 14$; $p < 0,001$), e a atividade exploratória, rearings ($t = 7,75$; $df = 14$; $p < 0,001$), quando comparados com o grupo controle (**Figura 14A**), uma indicação de comportamento tipo-maníaco. Entretanto, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína nestes animais, não houve alteração locomotora e exploratória nos animais, quando comparados com o grupo controle (**Figura 14B**).

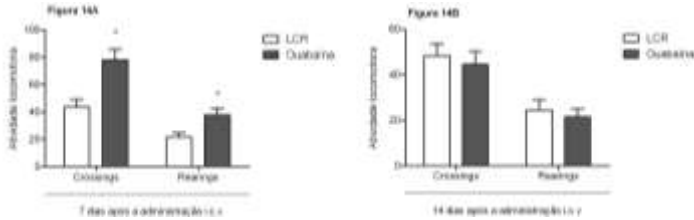


Figura 14. Atividade locomotora (crossings) e exploratória (rearings), 7 dias (A) e 14 dias (B) após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T para amostras independentes. * $p < 0.05$.

A **Figura 15** mostra que 14 dias após a administração de ouabaína, os animais apresentaram um aumento no tempo de imobilidade ($t = 11,42$; $df = 14$; $p < 0,001$) e uma redução da natação ($t = 7,75$; $df = 14$; $p < 0,001$) no teste do nado forçado, uma indicação de comportamento tipo-depressivo (**Figura 15A**). Além disso, a ouabaína diminuiu o consumo de sacarose ($t = 12,18$; $df = 14$; $p < 0,001$) nos animais, que foram testados 14 dias após a administração i.c.v. dessa substância, uma indicação de comportamento tipo-anedônico (**Figura 15B**).

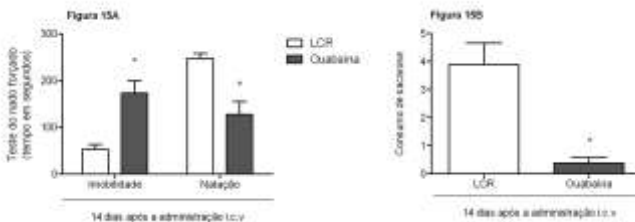


Figura 15. Teste do nado forçado(A) e do consumo de sacarose (B) 14 dias após a administração de ouabaína ou LCR nos ratos. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T para amostras independentes. * $p < 0,05$.

Como demonstrado na **Figura 16**, 14 dias após a administração de ouabaína houve um aumento no peso da glândula adrenal ($t = 7,54$; $df = 14$; $p < 0,001$) (**Figura 16A**) e um aumento nos níveis de ACTH ($t = 5,62$; $df = 14$; $p < 0,001$) (**Figura 16B**) em amostras de sangue destes animais, quando comparados com o grupo controle. Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis de corticosterona sérica (**Figura 16C**).

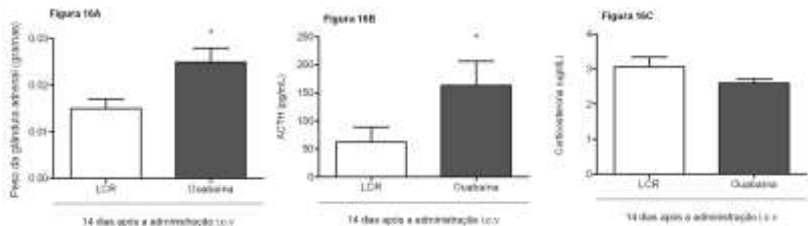


Figura 16. Parâmetros de alteração do eixo HPA 14 dias após a administração de LCR ou ouabaína em ratos. Peso da glândula adrenal (A). Níveis de ACTH (B) e corticosterona no sangue dos ratos (C). As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T para amostras independentes. * $p < 0,05$.

A Figura 17 indica o dano cognitivo induzido pela ouabaína, 14 dias após a administração i.c.v deste composto. No teste da esQUIVA inibitória, a ouabaína induziu diminuição do tempo de latência para descer da plataforma, tanto na memória de curta duração (Mann-Whitney U: 5,50; $p < 0,001$) quanto na memória de longa duração (Mann-Whitney U: 2,5; $p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle (Figura 17A), indicando dano na memória aversiva dos animais. Do mesmo modo, foi encontrada uma redução do índice de reconhecimento de objetos, tanto na memória de curta duração quanto na memória de longa duração, 14 dias após a administração i.c.v de ouabaína nos ratos (Figura 17B), uma indicação de prejuízo na memória de reconhecimento de objetos dos animais.

A ANOVA para medidas repetidas mostra diferença significativa entre os grupos [$F(1,28) = 79,66$; $p < 0,001$], para as repetições [$F(2,28) = 397,55$; $p < 0,001$] e para a interação entre os grupos e as repetições [$F(2,28) = 61,26$; $p < 0,001$].

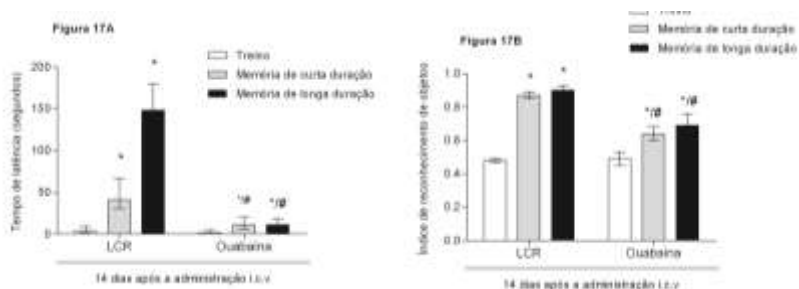


Figura 17. Avaliação da memória aversiva e da memória de reconhecimento de objetos, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. O painel 17A mostra o tempo de latência que o animal levou para descer da plataforma no teste da esQUIVA inibitória. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. As diferenças entre o treino e os testes

foram analisadas pelo teste de Wilcoxon, $*p < 0,05$. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste Whitney, $\#p < 0,05$. O painel **17B** mostra o índice de reconhecimento de objetos. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os mais diferentes parâmetros foram verificados através da análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey. $*p < 0,05$ para comparações em um mesmo grupo. $\#p < 0,05$ para comparações entre os grupos.

A **Figura 18** mostra os resultados dos níveis da proteína pró-BDNF e BDNF, 7 e 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína no córtex pré-frontal de ratos. O teste T revelou redução significativa dos níveis da proteína pró-BDNF ($t=3,12$; $df=6$; $p<0,05$) (**Figura 18A**) e BDNF ($t=3,02$; $df: 6$; $p<0,05$) (**Figura 18C**) no córtex pré-frontal destes animais, 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína. Porém, 14 dias após a administração deste composto não houve diferença significativa nos níveis de pró-BDNF e BDNF nesta mesma estrutura cerebral. O teste T não revelou diferenças significativas nos níveis de pró-BDNF e BDNF, 7 e 14 dias após a administração de ouabaína, no hipocampo.

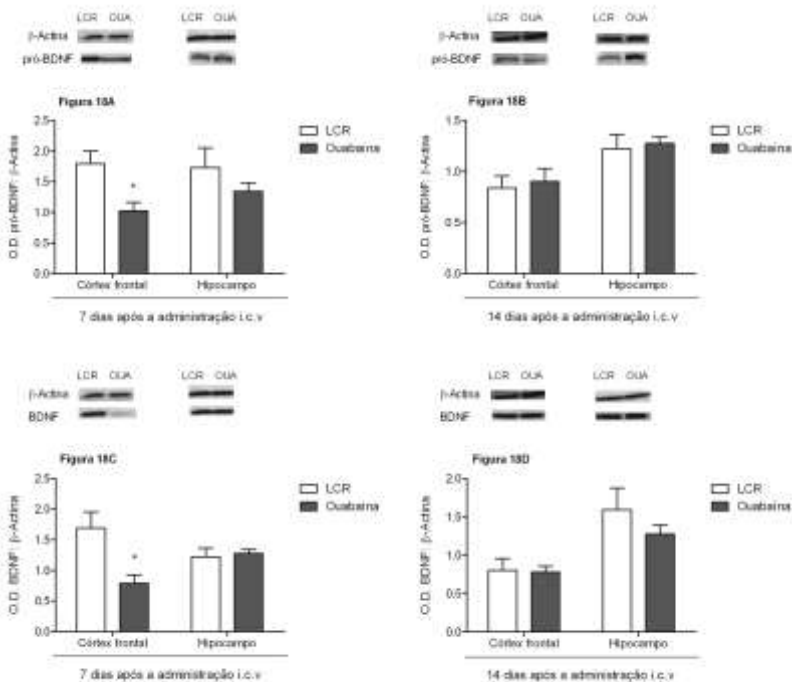


Figura 18. Níveis de pró-BDNF (A) e de BDNF (B) no córtex frontal e no hipocampo de ratos, 7 e 14 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T para amostras independentes. $*p < 0,05$.

Como podemos observar na **Figura 19**, houve uma diminuição dos níveis de TrkB, tanto no córtex frontal quanto no hipocampo, 7 [córtex frontal: $T = 4,98$; $df=13$; $p < 0,001$; hipocampo: $T = 6,44$; $df = 14$; $p < 0,001$] (**Figura 19A**) e 14 [córtex frontal: $T = 4,58$; $df = 13$; $p < 0,001$; hipocampo: $T = 7,41$; $df = 14$; $p < 0,001$](**Figura 19B**) dias após a administração i.c.v de ouabaína nos ratos.

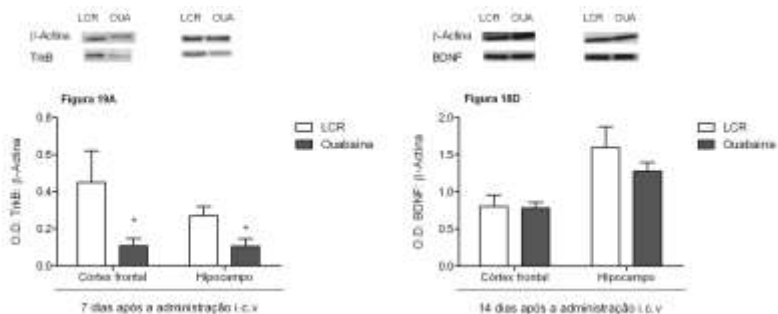


Figura 19. Níveis de TrkB no córtex frontal e no hipocampo de ratos, 7 (**A**) e 14 (**B**) dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T para amostras independentes. * $p < 0.05$.

A **Figura 20** nos mostra os níveis de fosforilação de CREB no sítio serina 133 no córtex frontal e no hipocampo de ratos 7 e 14 dias após a administração de LCR ou ouabaína. A ouabaína diminuiu a fosforilação de CREB, 7 [córtex frontal: $T = 3,74$; $df = 14$; $p = 0,002$; hipocampo: $T = 3,67$; $df = 14$; $p = 0,002$] (**Figura 20A**) e 14 [córtex frontal: $T = 8,66$; $df = 14$; $p < 0,001$; hipocampo: $T = 9,33$; $df = 14$; $p = 0,002$] (**Figura 20B**) dias após a sua administração, em ambas as estruturas cerebrais analisadas.

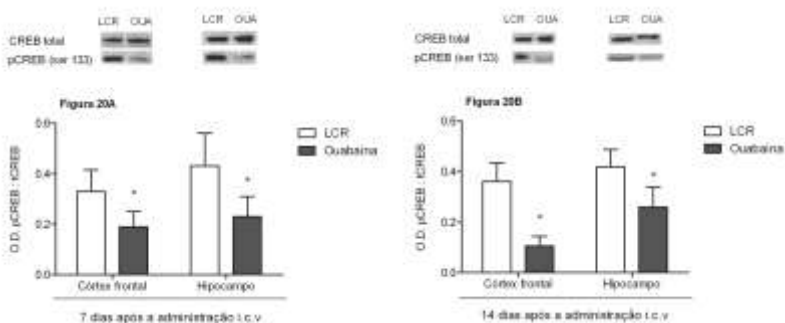


Figura 20. Níveis de pCREB no córtex frontal e no hipocampo de ratos, 7 (**A**) e 14 (**B**) dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T para amostras independentes. * $p < 0.05$.

A **Figura 21** mostra a avaliação dos efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, sobre a hiperatividade induzida por ouabaína, 7 dias após a sua administração. Como podemos observar, ouabaína induziu hiperatividade (**Figura 21A**) e aumento da atividade exploratória (**Figura 21B**) dos animais e ambos os estabilizadores do humor reverteram estes comportamentos tipo-maniaco. Segue os dados da ANOVA de duas vias para a administração de ouabaína [Crossings: $F(1,42) = 52,85$, $p < 0,05$; Rearings: $F(1,42) = 21,03$, $p < 0,001$], para os tratamentos [Crossings: $F(2,42) = 59,24$, $p < 0,001$; Rearings: $F(2,42) = 31,02$, $p < 0,001$] e para a interação entre a ouabaína e tratamentos [Crossings: $F(2,42) = 58,41$, $p < 0,001$; Rearings: $F(2,42) = 25,65$, $p < 0,001$].

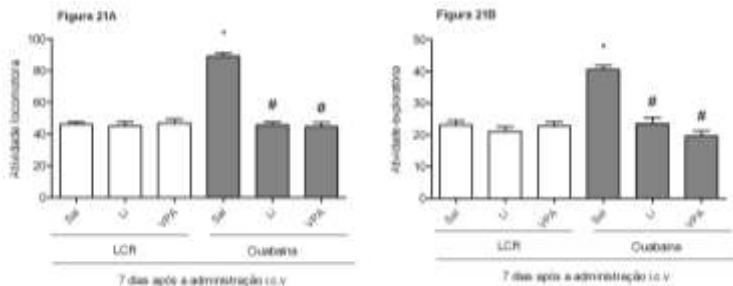


Figura 21. Efeitos dos estabilizadores do humor sobre a atividade locomotora, crossings (A), e exploratória, rearings (B), avaliados no teste do campo aberto, 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína nos ratos. A diferença entre os grupos foi avaliada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

A **Figura 22** mostra os efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre a atividade locomotora (**Figura 22A**) e exploratória (**Figura 22B**) 14 dias após a administração de LCR ou ouabaína em ratos. Como podemos observar, não houve alterações nos padrões de crossings e rearings entre os grupos.

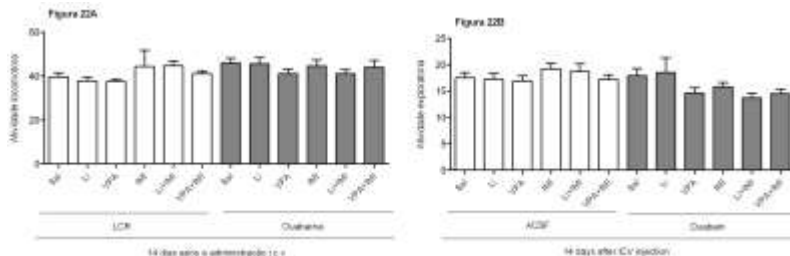


Figura 22. Efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre a atividade locomotora, crossings (A) e exploratória, rearings (B), 14 dias após a administração

i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. Os estabilizadores do humor foram administrados durante 14 dias a partir do dia da administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. A IMI foi administrada apenas três vezes, 24h, 5h e 1h antes do teste do campo aberto. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.

A Figura 23 mostra os efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre comportamentos tipo-depressivos induzidos pela ouabaína, 14 dias após a administração i.c.v dessa substância. Os estabilizadores do humor, Li e VPA, revertem parcialmente o tempo de imobilidade, no teste do nado forçado induzida pela ouabaína, enquanto que a IMI reverteu totalmente. A associação do Li ou VPA combinado com a IMI reverteu completamente a imobilidade induzida pela ouabaína e, além disso, diminuiu o tempo de imobilidade em relação ao controle (LCR+Sal). A administração de Li, VPA ou IMI diminuiu a imobilidade dos animais no teste do nado forçado, assim como a associação dos estabilizadores do humor, Li ou VPA, com IMI (Figura 23A). Além disso, os estabilizadores do humor, a IMI e a associação dos estabilizadores do humor, Li ou VPA, com a IMI revertem completamente a diminuição do consumo de sacarose induzida pela ouabaína (Figura 23B).

Segue os dados da ANOVA de duas vias para a administração de ouabaína [Imobilidade: $F(1,108) = 503,5$; $p < 0,001$; Consumo de sacarose: $F(1,108) = 14,61$; $p < 0,001$], para os tratamentos [Imobilidade: $F(5,108) = 184,31$; Consumo de sacarose: $F(5,108) = 17,27$; $p < 0,001$], e para a interação entre a ouabaína e administração dos tratamentos [Imobilidade: $F(5,108) = 75,97$; Consumo de sacarose: $F(5,108) = 23,17$; $p < 0,001$].

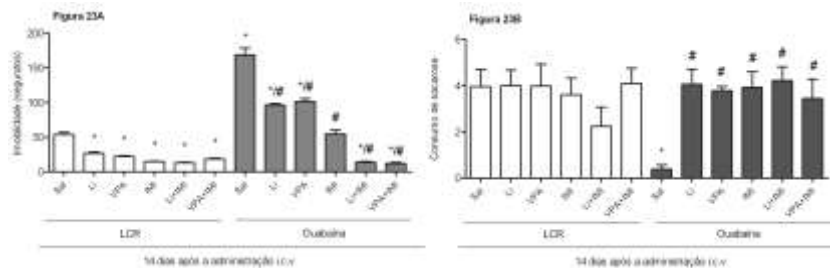


Figura 23. Efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre os testes do nado forçado (A) e o do consumo de sacarose (B), 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. Os estabilizadores do humor foram administrados durante 14 dias a partir do dia da administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. A IMI foi administrada apenas três vezes, 24h e 1h antes do teste do campo aberto. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.* $p < 0,05$ quando

comparado com o grupo controle (LCR+Sal). #p < 0,05 quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

A **Figura 24** mostra os efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre os níveis de ACTH no sangue e sobre o peso da glândula adrenal, 14 dias após a administração de LCR ou ouabaína. Como podemos observar a administração de ouabaína aumenta os níveis de ACTH no sangue dos animais e o tratamento com os estabilizadores do humor, com a IMI ou a combinação dos estabilizadores do humor, Li ou VPA, com a IMI revertem essa alteração hormonal induzida pela ouabaína (**Figura 24A**). Além disso, o tratamento com Li ou VPA, mas não com a IMI, conseguiu reverter o aumento do peso da glândula adrenal induzido pela ouabaína (**Figura 24B**). Segue os dados da ANOVA de duas vias para a administração de ouabaína [ACTH: $F(1,108) = 19,87$; $p < 0,001$; Adrenal: $F(1,108) = 9,96$; $p < 0,001$], para os tratamentos [ACTH: $F(5,108) = 48,34$; $p < 0,001$; Adrenal: $F(5,108) = 4,29$; $p < 0,001$], e para a interação entre ouabaína e administração dos tratamentos [ACTH: $F(5,108) = 31,73$; $p < 0,001$; Adrenal: $F(5,108) = 3,2$; $p < 0,001$].

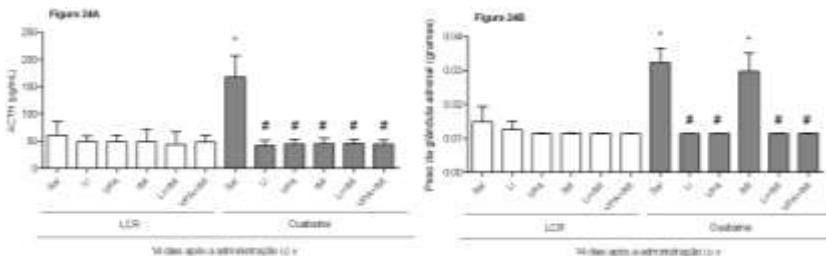


Figura 24. Efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre os níveis de ACTH (A) e o peso da glândula adrenal (B), 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. Os estabilizadores do humor foram administrados durante 14 dias a partir do dia da administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. A IMI foi administrada apenas três vezes, 24h e 1h antes do teste do campo aberto. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.*p < 0,05 quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). #p < 0,05 quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

A **Figura 25** mostra os efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre parâmetros de dano oxidativo a lipídeos, 7 dias após a administração i.c.v de ouabaína. Esse composto aumenta os níveis de LPH (**Figura 25A**), MDA (**Figura 25B**), HNE (**Figura 25C**) e 8-ISO (**Figura 25D**) no córtex frontal e no hipocampo de ratos, 7 dias após a administração i.c.v. O tratamento com Li reverteu o dano à lipídeos induzido pela ouabaína, em todos os parâmetros avaliados.

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para LPH 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex Frontal : $F(1,27) = 259,61$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 138,73$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 158,75$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 129,03$; $p < 0,001$] e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 139,71$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 108,70$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para MDA 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal : $F(1,27) = 35,44$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 26,45$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 28,24$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 36,19$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 27,43$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 34,07$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para HNE 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal : $F(1,27) = 33,08$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 57,83$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 15,27$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 39,31$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 32,79$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 48,82$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para 8-ISO 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal : $F(1,27) = 15,35$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 23,25$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 38,41$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 31,96$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 12,39$; $p = 0,0015$; hipocampo: $F(1,27) = 42,92$; $p < 0,001$]).

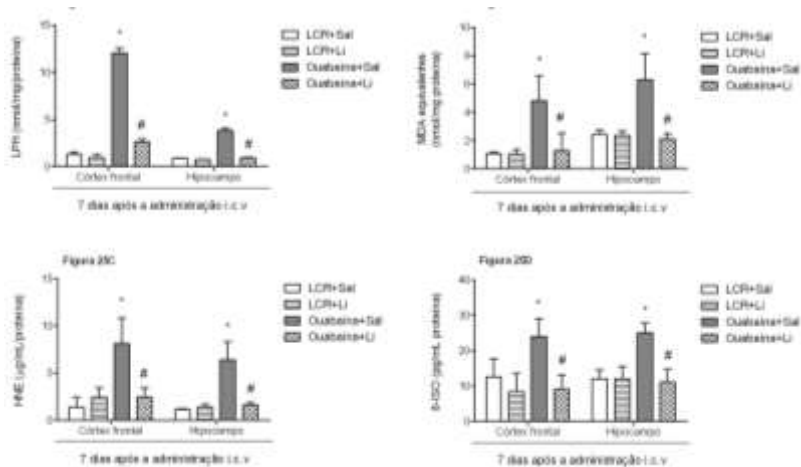


Figura 25. Efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre os parâmetros de dano oxidativo à lipídeos, LPH (A), MDA (B), HNE (C) e 8-ISO (D), 7 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 7 dias a partir do dia da administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

Na **Figura 26** podemos observar os efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre parâmetros de dano oxidativo a lipídeos, 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína. Nesse protocolo experimental, a ouabaína também aumentou os níveis de LPH (**Figura 26A**), MDA (**Figura 26B**), HNE (**Figura 26C**) e 8-ISO (**Figura 26D**) em ambas as estruturas cerebrais avaliadas, 14 dias após a administração i.c.v. O tratamento com Li reverteu o dano à lipídeos induzido pela ouabaína, em todos os parâmetros avaliados.

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para LPH 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 20,36$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 69,69$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 35,03$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 98,18$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 35,09$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 72,23$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para MDA 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 50,61$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 188,48$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 37,43$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 135,65$; $p < 0,001$], e interação

entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 44,08$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 66,78$; $p < 0,001$].

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para HNE 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 34,64$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 334,13$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 35,02$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 232,03$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex f: $F(1,27) = 22,07$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 222,06$; $p < 0,001$].

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para 8-ISO 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 10,58$; $p = 0,003$; hipocampo: $F(1,27) = 101,11$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 17,98$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 54,84$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 14,19$; $p < 0,001$; Hipocampo: $F(1,27) = 52,73$; $p < 0,001$].

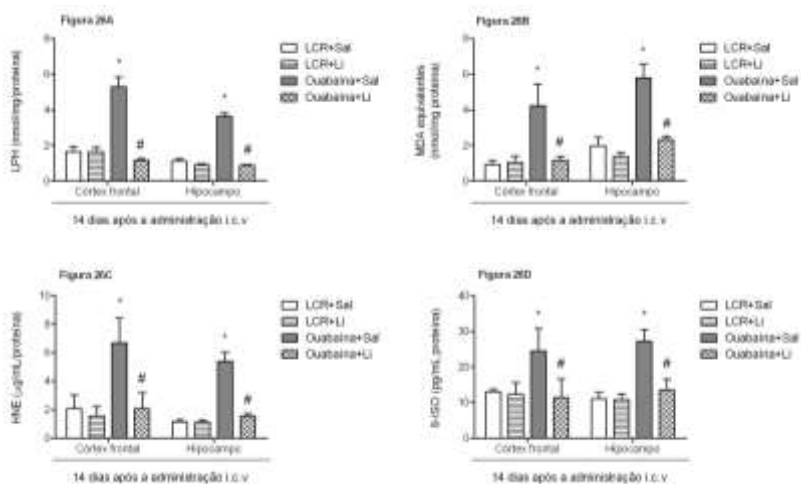


Figura 26. Efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre os parâmetros de dano oxidativo à lipídeos, LPH (A), MDA (B), HNE (C) e 8-ISO (D), 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 14 dias a partir do dia da administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.* $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

Na **Figura 27** está representado o efeito do estabilizador do humor, Li, sobre parâmetros de dano oxidativo a proteínas, 7 dias após a

administração i.c.v de LCR ou ouabaína. A administração i.c.v de ouabaína aumenta os níveis de grupamentos carbonila (A) e de 3-nitrotirosina (B), no córtex frontal e no hipocampo de ratos. O tratamento subcrônico com Li reverteu o dano a proteínas induzido pela ouabaína, em todos os parâmetros bioquímicos avaliados e em todas as estruturas analisadas.

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para carbonilação de proteínas 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 130,72$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 56,22$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 88,77$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 42,66$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 119,32$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 28,13$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para 3-nitrotirosina 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 273,5$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 90,65$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 231,86$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 76,04$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 221,45$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 78,77$; $p < 0,001$]).

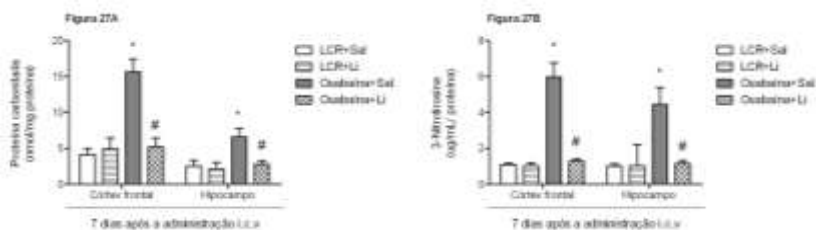


Figura 27. Gráficos dos efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre os parâmetros de dano oxidativo a proteínas, carbonilação de proteínas (A) e 3-nitrotirosina (B), 7 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 7 dias a partir do dia da administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.* $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

A **Figura 28** mostra os efeitos do Li sobre parâmetros de dano oxidativo a proteínas, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. Como podemos observar, houve um aumento nos níveis de grupamentos carbonila (A) e de 3-nitrotirosina (B), no córtex frontal e no hipocampo de ratos 14 dias após a administração de ouabaína. O

tratamento subcrônico com Li reverteu o dano às proteínas induzido pela ouabaína, em todos os parâmetros bioquímicos avaliados e em todas as estruturas cerebrais analisadas.

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para carbonilação de proteínas 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 95,13$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 106,07$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 84,07$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 132,37$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 118,73$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 166,04$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para 3-nitrotirosina 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 138,15$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 166,87$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 119,46$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 132,24$; $p < 0,001$], e interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 135,81$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 153,39$; $p < 0,001$]).

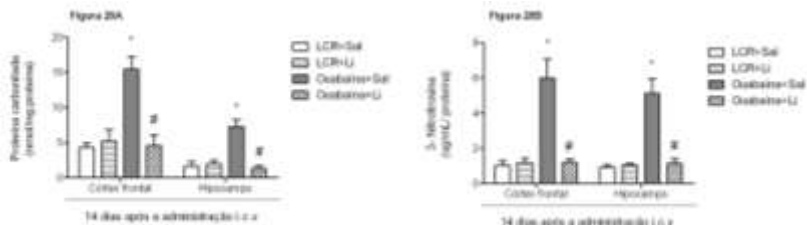


Figura 28. Efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre os parâmetros de dano oxidativo a proteínas, carbonilação de proteínas (A) e 3-nitrotirosina (B), 14 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 14 dias a partir do dia da administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

Na **Figura 29** estão representados os efeitos do Li sobre a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT, 7 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína. Como podemos observar, houve um aumentada atividade da SOD, no córtex frontal e no hipocampo de ratos 14 dias após a administração de ouabaína. O tratamento subcrônico com Li reverteu parcialmente essa alteração enzimática no córtex frontal e reverteu completamente no hipocampo (**Figura 29A**). Entretanto, a ouabaína diminuiu a atividade da CAT em

ambas as estruturas cerebrais analisadas, enquanto que Li reverteu completamente essa alteração no córtex frontal e parcialmente no hipocampo (**Figura 29B**).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da SOD 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal : $F(1,27) = 276,82$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 2287,54$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 75,82$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 207,67$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 55,63$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 197,6$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da CAT 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal : $F(1,27) = 28,41$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 77,2$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 14,95$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 19,22$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 28,02$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 34,86$; $p < 0,001$]).

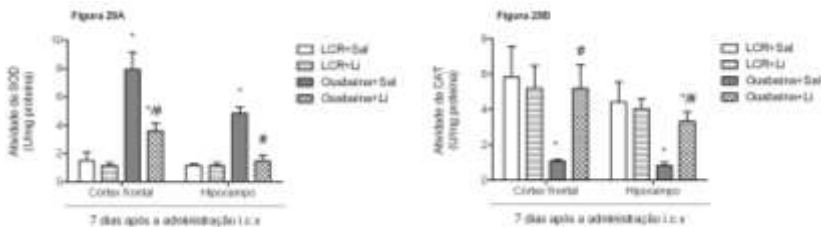


Figura 29. Efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e CAT (B), 7 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 7 dias a partir do dia da administração i.c.v de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.* $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

A **Figura 30** mostra os efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT, 14 dias após a administração i.c.v de LCR ou ouabaína. A administração i.c.v de ouabaína nos ratos aumentou atividade da SOD (**Figura 30A**) e diminuiu a atividade da CAT (**Figura 30B**), em ambas as estruturas cerebrais analisadas, 14 dias após a administração dessa substância. O

tratamento subcrônico com Li reverteu completamente todas as alterações enzimáticas induzidas pela ouabaína.

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da SOD 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 147,2$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 131,89$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 182,4$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 130,37$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 170,43$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 112,65$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da CAT 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 11,53$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 115,94$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 21,66$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 98,03$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 37,03$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 30,28$; $p < 0,001$]).

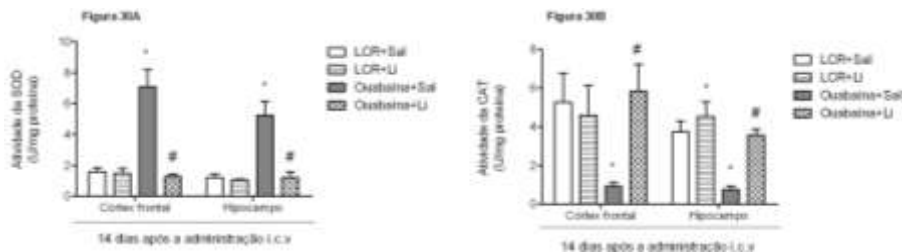


Figura 30. Efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e CAT (B), 14 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 14 dias a partir do dia da administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

A **Figura 31** mostra os efeitos do Li sobre a atividade das enzimas antioxidantes, GPx e GR, 7 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína. A administração i.c.v. de ouabaína nos ratos aumentou a atividade da GPx no córtex frontal e no hipocampo, 7 dias após a administração dessa substância. A administração subcrônica de Li reverteu completamente essa alteração enzimática induzida pela ouabaína, no córtex frontal. No hipocampo, o tratamento com Li reverteu completamente o aumento da atividade da GPx, induzida pela ouabaína, e, além disso, diminuiu a atividade dessa enzima em relação

ao controle (LCR+Sal) (**Figura 31A**). A ouabaína também aumentou a atividade da GR em ambas as estruturas cerebrais analisadas, e o tratamento com Li reverteu completamente essa alteração (**Figura 31B**).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da GPx 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal : $F(1,27) = 71,54$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 13,22$; $p = 0,0011$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 53,11$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 84,62$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex Frontal: $F(1,27) = 45,51$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 31,54$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da GR 7 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 63,12$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 63,13$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 78,47$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 109,41$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 50,72$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 67,18$; $p < 0,001$]).

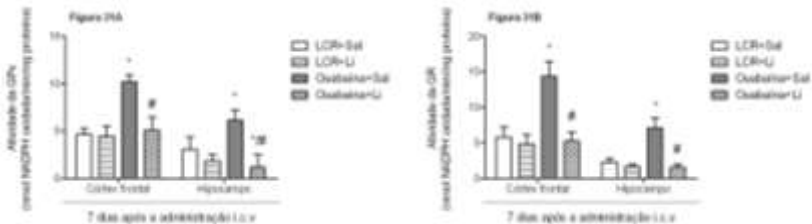


Figura 31. Efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre a atividade das enzimas antioxidantes GPx (A) e GR (B), 7 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 7 dias a partir do dia da administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

A **Figura 32** mostra os efeitos do Li sobre a atividade das enzimas antioxidantes, GPx e GR, 14 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína. Como podemos observar, houve um aumento da atividade das enzimas GPx (**Figura 32A**) e GR (**Figura 32B**) no córtex frontal e no hipocampo de ratos 14 dias após a administração de ouabaína. O tratamento subcrônico com Li reverteu todas as alterações enzimáticas induzidas pela ouabaína, em todos os parâmetros bioquímicos avaliados e em todas as estruturas cerebrais analisadas.

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da GPx 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 241,23$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 28,78$ $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 239,72$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 22,93$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 262,14$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 37,39$; $p < 0,001$]).

ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas para a atividade da GR 14 dias após a administração i.c.v. de ouabaína (administração de ouabaína [córtex frontal: $F(1,27) = 45,5$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 24,74$; $p < 0,001$], tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 44,17$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 19,38$; $p < 0,001$], interação entre a administração de ouabaína e tratamentos [córtex frontal: $F(1,27) = 28,15$; $p < 0,001$; hipocampo: $F(1,27) = 37,42$; $p < 0,001$]).

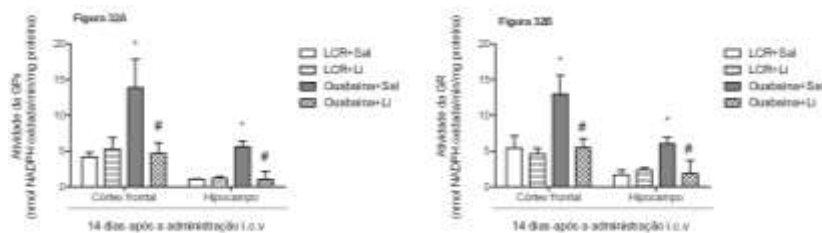


Figura 32. Gráficos dos efeitos do estabilizador do humor, Li, sobre a atividade das enzimas antioxidantes GPx (A) e GR (B), 14 dias após a administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. Li foi administrado durante 14 dias a partir do dia da administração i.c.v. de LCR ou ouabaína nos ratos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (LCR+Sal). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo ouabaína+Sal.

5 DISCUSSÃO

Transtornos psiquiátricos, de uma forma geral, e em particular o TB, são extremamente complexos de reproduzir em animais, pois a natureza subjetiva dos sintomas em humanos dificulta a avaliação objetiva das alterações comportamentais nos animais. Um modelo animal de uma determinada condição psiquiátrica deve cumprir três critérios principais: 1) compartilhar características fisiopatológicas da condição humana (validade de constructo); 2) apresentar manifestações

comportamentais semelhantes aos da condição humana (validade de face), 3) as quais devem ser revertidas com fármacos que também são eficazes contra sintomas observados em pacientes (validade preditiva) (Ellenbroek e Cools, 1990).

Diversos laboratórios de pesquisa tem validado o modelo animal de mania induzido pela ouabaína, uma vez que este compostomimetiza uma alteração fisiopatológica observada no TB, ou seja, a redução da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, que contempla a validade de constructo do modelo (El-Mallakh et al., 2003; Jornada et al., 2010; Riegel et al., 2010). Além disso, o presente estudo, assim como diversos outros, mostra que a administração de $5\mu\text{L}$ i.c.v de ouabaína na concentração de 10^{-3}M induz hiperatividade em ratos, a qual é revertida pela administração de estabilizadores do humor, como o Li e o VPA. Em um estudo prévio foi demonstrado que dependendo das condições metodológicas, a administração i.c.v de ouabaína também pode induzir hipoatividade em ratos, tal comportamento pode ser considerado tipo-depressivo (Liet al., 1997). Entretanto, esse comportamento é muito inespecífico para a depressão, sendo necessária uma melhor validação do modelo.

Este estudo demonstrou que 7 dias após a administração de ouabaína, os ratos apresentaram aumento da locomoção, um parâmetro de hiperatividade, o qual é considerado um comportamento tipo-maníaco. Além disso, quando avaliados 14 dias após a administração de ouabaína, esses mesmos animais apresentaram comportamentos tipo-depressivo, como aumento da imobilidade no teste do nado forçado e diminuição do consumo de sacarose. A partir desses dados, podemos sugerir que a administração i.c.v de ouabaína em ratos contemplou a validade de face para um modelo animal de TB adequado, mimetizando, assim, comportamentos tipo-maníaco e tipo-depressivo em um mesmo animal.

Os modelos animais existentes focam na indução de comportamentos que mimetizam a mania ou a depressão, separadamente (Machado-Vieira et al., 2004; Valvassori et al., 2013). Entretanto, nenhum estudo, até o momento, descreveu os dois tipos de comportamento, do tipo maníaco e do tipo depressivo, em um mesmo animal experimental, dificultando o desenvolvimento de um modelo animal de TB adequado (ver em Valvassori et al., 2013). O desenvolvimento do presente modelo animal de TB que mimetiza de maneira mais completa o ciclo maníaco-depressivo do transtorno tal como ocorre em humanos, poderá facilitar o estudo dessa patologia e

aperfeiçoar o desenvolvimento e o teste de novas alternativas terapêuticas.

Ambos os episódios de humor, mania e depressão, estão associados com a redução da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ (Looney e El-Mallakh, 1997; Li e El-Mallakh, 2004). Além disso, tem sido relatada uma diminuição da expressão do gene da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ no córtex frontal tanto de pacientes com TB quanto de pacientes com depressão maior (Tochigi et al., 2008). A $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ é uma enzima essencial para o funcionamento neuronal, mantendo e reestabelecendo, após cada despolarização, o gradiente eletroquímico, possibilitando que o neurônio retorne ao seu estado de repouso. Portanto, mudanças na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ pode ter importantes consequências sobre a função neuronal (El-Mallakh et al., 2000). Até mesmo uma pequena redução na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ pode aumentar a excitabilidade neuronal, levando o potencial de repouso próximo ao limiar, enquanto que, simultaneamente, aumenta a duração da liberação de neurotransmissores, através da diminuição da taxa de depuração de Ca^+ (Martin et al., 1966; McCarren and Alger, 1987). Contudo, é de se esperar que o aumento da carga positiva intracelular, que acompanha a inibição da atividade $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, também possa diminuir a liberação de neurotransmissores inibitórios dependentes de Cl^- , o que também dificulta a recuperação neuronal após o potencial de ação. Juntos esses estudos sugerem que uma modesta diminuição na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, que leva a hiperexcitação neuronal, induzindo a hiperatividade durante episódios de mania, observados em pacientes bipolares. E essas alterações, fisiopatológica e comportamental, também podem ser observadas nos animais que receberam ouabaína, um potente inibidor da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ (El-Mallakh and Wyatt, 1995; Herman et al., 2007).

Não existem muitos estudos que explicam mais detalhadamente o papel da inibição da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ na depressão bipolar. Entretanto, tem sido sugerido que a inibição duradoura da atividade desta enzima, que aumenta a excitabilidade celular e diminui o controle da repolarização neuronal, pode estar diminuindo a velocidade de recuperação neuronal e, conseqüentemente, diminuindo também a eficiência sináptica dos neurônios. Além disso, a diminuição da depuração de Ca^+ , induzida pela inibição da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, leva a um aumento exacerbado da liberação de neurotransmissores, causando depleção dos estoques dessas moléculas no neurônio. Essas alterações podem produzir prejuízos cognitivos e comportamentais, observados na depressão (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Herman et al.,

2007). Estudos prévios mostram que os modelos animais de depressão estão associados com a diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e que antidepressivos clássicos, que revertem comportamento tipo-depressivo nesses modelos, são capazes de aumentara atividade desta enzima (Gamaro et al., 2003; de Vasconcelos et al., 2005; Willner, 2005; Crema et al., 2010; Kirshenbaum et al., 2011).

Adicionalmente foi observado neste estudo que o comportamento tipo-depressivo induzido pela ouabaína, foi acompanhado pelo aumento do peso da glândula adrenal e dos níveis de ACTH no sangue dos ratos. Apesar disso, não foi encontrado diferenças em relação aos níveis de corticosterona no sangue destes animais. Essa discrepância talvez possa ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de que o cortisol é o ultimo hormônio da via a ser liberado e que, no momento da análise, os níveis deste hormônio nas amostras não foram o suficiente para que alguma alteração pudesse ser detectada. Outra explicação pode ser problemas metodológicos que não puderam ser detectados no momento da avaliação. Adicionais estudos precisam ser realizados para elucidar essas alterações fisiológicas induzidas pelo modelo.

É bem descrito na literatura que a exposição ao estresse leva a ativação do eixo HPA. Pacientes depressivos possuem níveis elevados de cortisol no sangue em resposta a excessiva liberação de ACTH. Além disso, esses pacientes apresentam aumento da hipófise e da glândula adrenal, em função da hipersecreção de ACTH e cortisol (Gold et al., 1988; de Kloet et al., 2005; Juruena et al., 2013). Do mesmo modo, animais submetidos aos modelos de depressão, induzidos por estresse crônico variado e por separação materna, apresentam um aumento da glândula adrenal e dos níveis de ACTH e de corticosterona no sangue, mimetizando, assim, alterações fisiológicas características da depressão (Owens e Nemeroff et al., 1993; Oomen et al., 2009). Neste estudo, a administração i.c.v de ouabaína em ratos, além de reproduzir comportamentos tipo-depressivos, aumentou a ativação do eixo HPA, que é uma alteração fisiológica importante, característica da depressão. Apesar de os níveis de corticosterona não terem sido alterados, podemos considerar hiperativação do eixo HPA pelo aumento dos níveis de ACTH e da hipertrofia da glândula adrenal.

Considerando que pacientes bipolares apresentam alterações cognitivas importantes (Wheeler et al., 1997; Hoertnagl et al., 2011), no presente estudo foi avaliada a memória aversiva e a memória de reconhecimento de objetos nos animais. Os testes cognitivos foram aplicados 14 dias após a administração de ouabaína, período no qual os animais apresentavam comportamentos tipo-depressivo. Podemos

observar que os animais submetidos à administração i.c.v de ouabaína apresentaram déficits cognitivos, tanto na memória de curta quanto na memória de longa duração, em ambos os testes - esquivia inibitória e reconhecimento de objetos.

De acordo com nossos estudos, Kirshenbaum e colegas (2011), demonstraram que animais *knockout* heterozigotos para $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, os quais possuíam uma maior susceptibilidade para comportamentos tipo-depressivo, também apresentaram déficit cognitivo no teste de reconhecimento de objetos. Em adição, um estudo prévio demonstrou que ratos submetidos ao modelo de depressão induzido por estresse crônico variado apresentaram diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ no hipocampo, que foi acompanhada por déficit na memória espacial dos animais (de Vasconcellos et al., 2005). Existem evidências de que a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ tem um papel fundamental no potencial de longa duração e que a inibição dessa enzima pode causar depressão sináptica de longa duração, diminuindo assim a plasticidade sináptica e, conseqüentemente, a memória (Glushchenko e Izvarina, 1997; Reich et al., 2004). Entretanto, isso não significa que, necessariamente, a atividade reduzida da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, induzida pela ouabaína, seja a única causa da perda de memória nos ratos observada neste estudo. É provável que adicionais mecanismos estejam envolvidos neste efeito, como por exemplo, a alteração de fatores neurotróficos.

Nos transtornos do humor, danos a resiliência e a plasticidade neuronal, com conseqüente prejuízo cognitivo, parecem estar envolvidos com alterações nas vias de regulação e expressão dos fatores neurotróficos (Soeiro-de-Souza et al., 2012). Neste estudo, primeiramente foi observado uma diminuição dos níveis de pró-BDNF, 7 dias após a administração i.c.v de ouabaína em ratos. O pró-BDNF é a isoforma do BDNF imaturo, a qual é clivada e liberada na sua forma madura, ou seja, na forma de BDNF, promovendo sobrevivência e crescimento neuronal ao ativar seu respectivo receptor TrkB (Matsumoto et al., 2008).

Posteriormente o presente estudo encontrou níveis diminuídos de BDNF no córtex frontal dos ratos, 7 dias após a administração de ouabaína, período em que os animais apresentaram comportamentos tipo-maníaco. Estes dados corroboram com estudos prévios de nosso laboratório, em que a ouabaína diminuiu os níveis de BDNF no córtex frontal e hipocampo de ratos (Jornada et al., 2010). Apesar de ambos os trabalhos possuírem o mesmo desenho experimental, no presente estudo a ouabaína reduziu os níveis de BDNF somente no córtex frontal dos animais. Essa diferença pode ser explicada, pelo menos em parte, pela

diferença metodológica. O presente estudo analisou os níveis de BDNF através da técnica de *immunoblotting*, enquanto que o estudo anterior, de Jornada e colaboradores (2010), realizou esta análise por ELISA-sanduíche.

Um estudo clínico demonstrou que os níveis séricos de BDNF estão diminuídos durante os episódios maníacos e depressivos, e que os níveis desta neurotrofina foram negativamente correlacionados com a gravidade dos sintomas nos pacientes (Cunha et al., 2006). Além disso, estudos *postmortem* também mostram uma diminuição dos níveis de BDNF e aumento de proteínas pró-apoptóticas no córtex frontal de pacientes bipolares (Kim et al., 2010). Rybakowski e colegas (2003) demonstraram uma significativa relação entre o desempenho em testes neuropsicológicos, envolvendo o córtex frontal de pacientes bipolares, e o polimorfismo Val66Met no gene de BDNF. Os pacientes com o genótipo Val/Val, sem o polimorfismo, obtiveram resultados superiores nos testes neuropsicológicos quando comparados com os pacientes com genótipo Val66Met. Assim como estes, diversos outros grupos de pesquisa tem sugerido que a via de BDNF possui um papel chave no TB, principalmente no dano neuronal e no deterioro cognitivo, ambos vistos nos pacientes acometidos por este transtorno (Craddock et al., 2005; de Oliveirae et al., 2009; Kapczinski et al., 2009; Soontornniyomkij et al., 2011; Thompson Ray et al., 2011; Huang et al., 2012).

O complexo BDNF/TrkB inicia uma cascata de sinalização intracelular, aumentando a ativação de fatores de transcrição, como o CREB, que induz a transcrição de genes de BDNF e outros genes importantes para a sobrevivência neuronal (Hetman et al., 1999; Xia et al., 2010). No presente estudo foi demonstrado uma diminuição nos níveis do receptor de TrkB e da fosforilação de CREB no córtex frontal e no hipocampo, tanto nos animais que apresentaram comportamentos tipo-maníaco quanto nos que apresentaram comportamentos tipo-depressivo. Entretanto, é necessário enfatizar que neste estudo foi encontrado diminuição de BDNF somente no córtex frontal 7 dias após a administração de ouabaína, ou seja, durante a manifestação de comportamentos tipo-maníaco. Levando em consideração o papel da sinalização do receptor TrkB na plasticidade sináptica, uma diminuição na expressão dessa proteína no córtex frontal e hipocampo dos ratos pode estar relacionado a diminuição da fosforilação de CREB observada no presente estudo, independentemente dos níveis de BDNF.

Após a sua ativação, CREB promove a transcrição ao ligar-se a um determinado sítio na região promotora de genes alvo, regulando a expressão de uma ampla variedade de genes capazes de regular funções

celulares importantes para a sobrevivência e plasticidade celular. Exemplos de alvos moleculares *downstream* à CREB são numerosos, incluindo o próprio BDNF, a proteína linfoma de células B2 (Bcl-2) e o fator de transcrição c-fos. Assim, CREB/pCREB pode ser visto como um ponto de convergência de um grande número de vias de sinalização (Blendy, 2006), a maioria das quais estão envolvidas na fisiopatologia do TB. Essa proteína tem uma variedade de funções importantes no cérebro, que envolve diferentes sistemas e comportamentos, tais como a memória, o aprendizado, ritmos circadianos, ansiedade, regulação do humor, plasticidade neuronal, bem como diferenciação e desenvolvimento neuronal (Lonze e Ginty, 2002; Carlezon et al., 2005).

Corroborando com os nossos resultados, Thompson Ray e colegas (2011), em um estudo *postmortem*, demonstraram uma diminuição da expressão de BDNF e de TrkB no hipocampo de indivíduos com TB. Foi observado também uma diminuição de RNAm de TrkB no córtex entorrinal de pacientes bipolares (Paz et al., 2006). Dowlatshahi e colegas (1999) encontraram níveis diminuídos de CREB no cérebro de pacientes bipolares que cometeram suicídio e nos pacientes tratados com anticonvulsivantes. Além disso, em um recente estudo foram avaliados os níveis de pCREB basais e estimulados com um ativador forskolina em linfócitos de pacientes bipolares responsivos a Li e seus parentes. Neste trabalho, os pesquisadores mostraram que os níveis basais de CREB não foram alterados pelo tratamento com Li, mas a estimulação, com *forskolin*, das células sanguíneas levou a um aumento de 24% dos níveis de pCREB nos indivíduos saudáveis, mas não nos pacientes bipolares e nos seus parentes. Este estudo sugere que a sinalização anormal de CREB pode ser observada até mesmo em pacientes tratados e responsivos a Li (Alda et al., 2013). Juntos esses estudos mostram que a alteração da via de sinalização TrkB/CREB, a qual está relacionada aos circuitos de plasticidade sináptica e neuronal, pode estar envolvida com a fisiopatologia do TB.

Com o intuito de continuar validando o modelo, foram avaliados os efeitos dos estabilizadores do humor, Li e VPA, e do antidepressivo IMI sobre os comportamentos e alterações fisiológicas induzidas por ouabaína. Essa fase do trabalho teve como objetivo avaliar a validade preditiva do modelo.

Estudos pré-clínicos, do nosso e de outros grupos de pesquisa, mostram que quando a ouabaína é administrada i.c.v em ratos induz hiperatividade motora (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Decker et al., 2000), que pode persistir por mais de uma semana após uma única injeção (Ruktanonchai et al., 1998; Jornada et al., 2010; Riegel et al., 2010). No

presente estudo conseguimos reproduzir dados de estudos prévios do nosso laboratório, em que Li e VPA reverteram comportamento hiperativo induzido por ouabaína no teste do campo aberto, sugerindo que este modelo contempla a validade de face e validade preditiva como um modelo animal de mania (Jornada et al, 2010).

O presente estudo mostrou também que o tratamento com o antidepressivo IMI ou o tratamento adjunto de Li ou VPA com IMI reverteram o comportamento tipo-depressivo, aumento da imobilidade no teste do nado forçado e a diminuição do consumo de sacarose, induzidos por ouabaína. O tratamento com Li ou VPA *per se* reverteram parcialmente a imobilidade no teste do nado forçado, mas, reverteram completamente a diminuição do consumo de sacarose induzidos por ouabaína. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com Li, VPA e Li ou VPA combinado com IMI reverteram o aumento dos níveis de ACTH e do peso da adrenal induzidos por ouabaína. O tratamento com IMI reverteu somente o aumento de ACTH. A partir desses dados podemos sugerir que a administração de ouabaína i.c.v em ratos é um bom modelo animal de TB, pois contempla todas as características para um modelo animal de transtorno psiquiátrico: validade de constructo, validade de face e, finalmente, validade preditiva.

Como descrito anteriormente, os modelos animais de depressão estão associados com a diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, enquanto o tratamento com antidepressivos previnem e revertem comportamentos tipo-depressivo e são capazes de aumentar a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Gamaro et al., 2003; de Vasconcellos et al., 2005; Willner, 2005; Gamaro et al., 2008; Crema et al., 2010). Ratos expostos ao estresse crônico variado, além de apresentarem um aumento da imobilidade no teste do nado forçado, também apresentam uma diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ no hipocampo e na amígdala. A administração de fluoxetina e Li nesses animais previnem tanto o aumento da imobilidade no teste do nado forçado quanto a diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (de Vasconcellos et al. 2005; Gamaro et al. 2003; 2008). Um estudo *in vitro* demonstrou também que IMI aumenta a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ no hipotálamo e no mesencéfalo de ratos (Viola et al., 2007). Portanto, podemos sugerir que os efeitos terapêuticos, tanto dos estabilizadores do humor quanto do antidepressivo IMI, observados no presente estudo, pode estar associado ao aumentando da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, a qual foi inibida pela ouabaína. Além disso, tanto os estabilizadores do humor quanto os antidepressivos também são conhecidos por sua capacidade de neuroproteção (Huang e Reichardt, 2001), o que pode estar participando

dos efeitos antimaníacos e antidepressivos desses fármacos, respectivamente.

Neste estudo foi demonstrado que tanto os comportamentos tipo-maníacos quanto os comportamentos tipo-depressivos foram acompanhados por um aumento no dano oxidativo a lipídios e a proteínas no córtex frontal e hipocampo de ratos. Os resultados mostram um aumento de LPH, MDA, HNE e 8-ISO no córtex frontal e no hipocampo dos animais submetidos à administração de ouabaína, 7 e 14 dias após a administração deste composto. Além disso, foi encontrado um aumento da nitração e oxidação de proteínas em ambas as estruturas cerebrais avaliadas após a administração de ouabaína nos animais. O tratamento com Li reverteu completamente o dano oxidativo a lipídeos e a proteínas induzidos pela ouabaína.

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliar o estresse oxidativo. O MDA é um aldeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados por cisão beta dos ácidos graxos poliinsaturados peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. O HNE, um aldeído insaturado, é o produto quantitativamente mais importante da degradação peroxidativa de ácidos graxos omega-6. Além disso, o HNE apresenta alta citotoxicidade, principalmente devido à sua propriedade de formar bases de Schiff pela reação com aminoácidos, sobretudo com os resíduos de lisina e histidina, presentes nas proteínas e de eteno adutos com bases do DNA. A determinação dos isoprostanos é um dos mais recentes e promissores métodos na mensuração da lipoperoxidação (Lawson et al., 1999). Os isoprostanos são produtos derivados da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por via nãoenzimática. Os isoprostanos mais comumente determinados são da família F2-isoprostanos, como o 8-ISO, derivados da oxidação do ácido araquidônico (Moore, Roberts, 1998).

Prévios estudos de nosso laboratório de pesquisa demonstraram que a administração de ouabaína em ratos aumenta a formação de grupamentos carbonila e de MDA no córtex frontal e hipocampo de ratos, 7 dias após a administração dessa substância (Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011). Jornada e colegas (2011) demonstraram que o dano oxidativo a proteína e a lipídeos induzidos por ouabaína foram prevenidos e revertidos pelo tratamento com estabilizadores do humor, Li e VPA. Estudos *postmortem* tem demonstrado que pacientes

bipolares apresentam níveis elevados de grupamentos carbonila, 3-nitrotirosina, HNE e 8-ISO no córtex pré-frontal (Wang et al., 2009; Andrezza et al., 2010; 2013). Além disso, foi demonstrado uma significativa diminuição da atividade da Na⁺K⁺ATPase associada a um aumento da peroxidação lipídica no soro de pacientes bipolares. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores demonstraram que ao mesmo tempo em que o tratamento com Li aumentou a atividade da Na⁺K⁺ATPase, diminuiu também a peroxidação lipídica no soro desses pacientes (Banerjee et al., 2012). Juntos esses estudos sugerem que a diminuição da Na⁺K⁺ATPase pode ser um fator chave para o dano oxidativo observado no TB e que um dos mecanismos terapêuticos do Li contra o estresse oxidativo pode estar ligado ao aumento da atividade dessa enzima. Os resultados demonstrados nesse trabalho mostram que os animais administrados com ouabaína também apresentaram dano oxidativo indicando mais uma vez que o presente modelo mimetiza alterações fisiopatológicas observadas nos pacientes com TB.

No presente estudo foram encontradas alterações na atividade das enzimas antioxidantes, em ambos os protocolos experimentais, 7 e 14 dias após a administração de ouabaína. Foi observado um aumento da atividade da SOD e uma diminuição da atividade da CAT no córtex frontal e hipocampo dos ratos. No córtex frontal, o tratamento com Li reverteu parcialmente o aumento da SOD induzida por ouabaína e reverteu completamente a diminuição da CAT induzida por ouabaína, 7 dias após a administração i.c.v. Neste mesmo protocolo experimental, o tratamento com Li reverteu completamente o aumento da SOD induzida por ouabaína e reverteu parcialmente a diminuição da CAT induzida por este composto, no hipocampo. Nos animais que foram avaliados 14 dias após a administração i.c.v, Li foi capaz de reverter completamente essas alterações enzimáticas induzidas pela ouabaína. Essas diferenças talvez possam ser explicadas pelo tratamento mais prolongado com Li nos animais que foram avaliados 14 dias após a administração i.c.v.

O presente estudo conseguiu reproduzir dados de estudos prévios, em que o tratamento com Li foi capaz de reverter comportamento do tipo maníaco e proteger o cérebro de ratos contra alterações na atividade da SOD e da CAT induzidos por ouabaína (Jornada et al., 2011). A enzima antioxidante SOD também foi encontrada aumentada no sangue de pacientes bipolares, durante episódios de mania e de depressão (Kunz et al., 2008). Adicionalmente, Machado-Vieira e colegas (2007) demonstraram que os níveis de MDA e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT estavam aumentadas em pacientes bipolares não medicados durante episódios maníacos, quando comparados com os

controles saudáveis. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que o tratamento agudo com Li reduziu significativamente os níveis de MDA e da atividade das enzimas antioxidante no sangue dos pacientes bipolares.

O presente estudo mostrou também que a administração de ouabaína aumentou a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR no córtex frontal e hipocampo de ratos, nos períodos em que os animais apresentaram comportamento tipo-maniaco e tipo-depressivos. O tratamento com Li foi capaz de reverter essas alterações enzimáticas induzidas por ouabaína em ambos os protocolos experimentais.

Corroborando com o nosso estudo, Andrezza e colegas (2009) evidenciaram um aumento de GST e de GSR, no sangue de pacientes bipolares em estágios iniciais do transtorno. Adicionalmente o tratamento com N-acetil cisteína, um precursor de glutatona, em pacientes com TB, melhorou os sintomas maníacos e hipomaníacos desses pacientes (Magalhães et al., 2013). Além disso, modelos animais, tanto de mania quanto de depressão, tem demonstrado níveis alterados da GPx e da GR no cérebro. Corroborando com os nossos resultados, um recente estudo, usando um modelo animal de depressão induzido por estresse de contenção, encontrou níveis aumentados da atividade das enzimas GPx e GR no córtex cerebral e hipocampo de roedores (Budni et al., 2013). Isso indica que modelos animais de depressão induzem alterações das enzimas antioxidantes como visto no nosso estudo, porem em um modelo que mimetiza não somente sintomas tipo-depressivo, mas também tipo mania. Igualmente corroborando com os nossos dados Brocardo e colegas (2010) mostraram alterações das enzimas antioxidantes, GPx e GR, no córtex frontal e hipocampo de ratos logo após a administração i.c.v de ouabaína, porem esse estudo mostra diminuição da atividade dessas enzimas e nós encontramos aumento da atividade destas enzimas antioxidantes. Essa discrepância pode ser explicada, pelo menos em partes, pelo fato de que os desenhos experimentais foram diferentes. No estudo prévio, os níveis da GPx e da GR no cérebro dos animais foram avaliadas logo após a administração i.c.v de ouabaína em ratos, representando estágios iniciais da mania bipolar, enquanto que no presente estudo os níveis das enzimas antioxidantes foram avaliados 7 ou 14 dias após a administração de ouabaína, representando estágios mais tardios do transtorno. Neste mesmo estudo, de Brocardo e colaboradores (2010), foi demonstrado que Li foi capaz de prevenir os efeitos deletérios da ouabaína sobre as atividades das enzimas antioxidantes, tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo dos ratos. Além disso, em um modelo animal de mania

induzido por anfetamina, o tratamento com Li também foi capaz de modular as enzimas GPx e GR, protegendo o cérebro de ratos contra o dano oxidativo a proteínas e lipídeos induzidos pela anfetamina (Macêdo et al., 2013). Junto com os nossos resultados, esses estudos sugerem que alterações da atividade da GPx e da GR pode ser um fator importante envolvido na fisiopatologia dos transtornos de humor e que um dos efeitos terapêuticos de Li pode ser modular a atividade das enzimas antioxidantes, protegendo, assim, o cérebro contra danos oxidativo.

De acordo com os dados apresentados neste trabalho, o modelo de ouabaína para o TB parece se o único modelo animal disponível que cumpre os três critérios para um modelo animal adequado do TB. Pois, resumidamente, no presente estudo foi encontrado: 1) comportamento tipo-maniaco, 7 dias após a administração de ouabaína, e comportamento tipo-depressivo 14 dias após a administração desse composto; 2) alterações fisiológicas características da depressão nos ratos, como aumento dos níveis de ACTH no sangue e aumento do peso da glândula adrenal, 14 dias após a administração de ouabaína, período no qual os animais apresentavam comportamento tipo-depressivo; 3) déficit cognitivo, o qual faz parte da sintomatologia do TB, 14 dias após a administração de ouabaína; 4) alterações na via de BDNF – como diminuição dos níveis de pro-BDNF, de BDNF, de TrkB e de pCREB – que são alterações neuroquímicas características do TB; 5) a administração de estabilizadores do humor, Li ou VPA, revertem os sintomas tipo-maniaco e a administração de Li, VPA, do antidepressivo IMI ou o tratamento adjunto de estabilizadores do humor, Li ou VPA com IMI revertem os comportamentos tipo-depressivos nos animais; 6) a administração de ouabaína, em ambos os protocolos experimentais, induziu dano oxidativo a lipídeos e a proteínas e alterou a atividade das enzimas antioxidante nos ratos. Enquanto que o tratamento com Li foi capaz de modular a atividade das enzimas antioxidantes e proteger o cérebro dos ratos contra o dano oxidativo induzido pela ouabaína.

Portanto, podemos sugerir que o modelo animal de TB proposto no presente estudo pode ser considerado um bom modelo animal de TB, pois possui validade de constructo, validade de face e validade preditiva. Esse modelo pode ser usado para o estudo da neurobiologia do TB e para *screening* de novos fármacos, que sejam eficazes tanto para a mania quanto para a depressão bipolar. Além de consolidar o modelo animal de TB induzido por ouabaína, nossos resultados também sugerem que a diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, vista em pacientes bipolares, pode estar diretamente ligada ao aumento de

glicocorticoides, a diminuição da ativação da via de sinalização BDNF e ao dano oxidativo, que levam a atrofia e diminuição da sobrevivência neuronal e, conseqüentemente, as alterações de humor e prejuízo cognitivo, característicos desses pacientes. Enquanto que os estabilizadores do humor e antidepressivos agem contra essas alterações deletérias, promovendo crescimento e sobrevivência neuronal, melhorando, assim, os sintomas do transtorno (**Figura 33**).

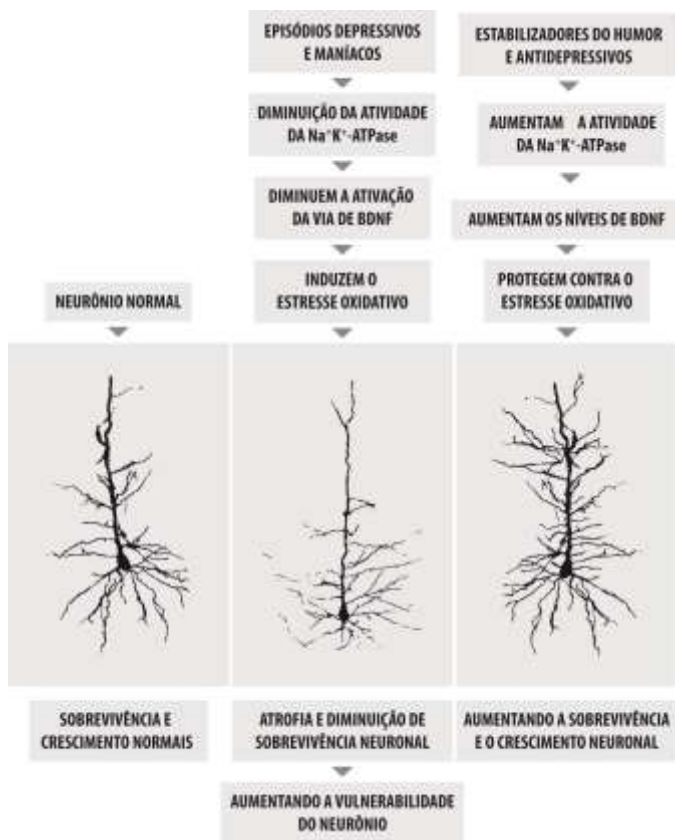


Figura 33. Conseqüências da diminuição da atividade da Na⁺K⁺ATPase sobre a plasticidade e crescimento neuronal. A diminuição da atividade da Na⁺K⁺ATPase, vista em pacientes bipolares, pode estar diretamente ligada ao aumento de glicocorticóides, a diminuição da ativação da via de BDNF e ao dano oxidativo, que levam a atrofia e diminuição da sobrevivência neuronal e, conseqüentemente, as alterações de humor e prejuízo cognitivo, característicos desses pacientes. Enquanto que os estabilizadores do humor e antidepressivos agem contra essas alterações deletérias, promovendo crescimento e sobrevivência neuronal, melhorando, assim, os sintomas do transtorno.

REFERÊNCIAS

- Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Zappellini G, Ferreira GK, Gomes LM, Carvalho-Silva M, Luciano TF, Marques SO, Streck EL, Souza CT, Quevedo J. Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochem Int.* 2011; 59(8):1163-74.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105 (1):121-6.
- Alda M, Shao L, Wang JF, Lopez de Lara C, Jaitovich-Groisman I, Lebel V, Sun X, Duffy A, Grof P, Rouleau GA, Turecki G, Young LT. Alterations in phosphorylated cAMP response element-binding protein (pCREB) signaling: an endophenotype of lithium-responsive bipolar disorder? *Bipolar Disord.* 2013; 15(8):824-31.
- Altshuler LL, Bartzokis G, Grieder T, Curran J, Mintz J. Amygdala enlargement in bipolar disorder and hippocampal reduction in schizophrenia: an MRI study demonstrating neuroanatomic specificity. *Arch Gen Psychiatry.* 1998; 55(7):663-4.
- American Psychiatric Association. *DSM-IV: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais.* 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.
- 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, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2010; 67(4):360-8.
- 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.

- Bachmann RF, Wang Y, Yuan P, Zhou R, Li X, Alesci S, Du J, Manji HK. Common effects of lithium and valproate on mitochondrial functions: protection against methamphetamine-induced mitochondrial damage. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009; 12(6):805-22.
- Banasr M, Duman RS. Keeping 'trk' of antidepressant actions. *Neuron*. 2008; 59(3):349-51.
- Banerjee U, Dasgupta A, Rout JK, Singh OP. Effects of lithium therapy on Na⁺-K⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 37(1):56-61.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987; 32(1):279-312.
- Barbosa IG, Rocha NP, Huguete RB, Ferreira RA, Salgado JV, Carvalho LA, Pariente CM, Teixeira AL. Executive dysfunction in euthymic bipolar disorder patients and its association with plasma biomarkers. *J Affect Disord*. 2012; 137(1-3):151-5.
- Barros HM, Ferigolo M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998; 23(2):279-86.
- Bearden CE, Thompson PM, Dutton RA, Frey BN, Peluso MA, Nicoletti M, Dierschke N, Hayashi KM, Klunder AD, Glahn DC, Brambilla P, Sassi RB, Mallinger AG, Soares JC. Three-dimensional mapping of hippocampal anatomy in unmedicated and lithium-treated patients with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(6):1229-38.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271(5):1424-37.
- Berggren U, Tallstedt L, Ahlenius S, Engel J. The effect of lithium on amphetamine-induced locomotor stimulation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1978; 59(1):41-5.
- Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PV, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in

- bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011; 35(3):804-17.
- Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* 1989; 341(6239):197-205.
- Blendy JA. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry.* 2006; 59(12):1144-50.
- Bowden CL. Anticonvulsants in bipolar disorders: current research and practice and future directions. *Bipolar Disord.* 2009; 11(2):20-33.
- Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(12):38-43.
- Brocardo PS, Budni J, Pavesi E, Franco JL, Uliano-Silva M, Trevisan R, Terenzi MG, Dafre AL, Rodrigues AL. Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. *Bipolar Disord.* 2010; 12(4):414-24.
- Bruno SD, Barker GJ, Cercignani M, Symms M, Ron MA. A study of bipolar disorder using magnetization transfer imaging and voxel-based morphometry. *Brain.* 2004; 127(11):2433-40.
- Bruno S, Cercignani M, Ron MA. White matter abnormalities in bipolar disorder: a voxel-based diffusion tensor imaging study. *Bipolar Disord.* 2008; 10(4):460-8.
- Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, dos Santos AA, Moretti M, Valvassori SS, Ornell F, Quevedo J, Farina M, Rodrigues AL. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol.* 2013; 240(1):112-21.
- Caldwell PC, Hodgkin AL, Keynes RD, Shaw TL. The effects of injecting 'energy-rich' phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of *Loligo*. *J Physiol.* 1960; 152(1):561-90.

- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985; 113(1):484-90.
- Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 2005; 28(8):436-45.
- Carter CJ. Multiple genes and factors associated with bipolar disorder converge on growth factor and stress activated kinase pathways controlling translation initiation: implications for oligodendrocyte viability. *Neurochem Int.* 2007; 50(3):461-90.
- Cavanagh JT, Van Beck M, Muir W, Blackwood DH. Case-control study of neurocognitive function in euthymic patients with bipolar disorder: an association with mania. *Br J Psychiatry.* 2002; 180(1):320-6.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3):527-605.
- Chepenik LG, Fredericks C, Papademetris X, Spencer L, Lacadie C, Wang F, Pittman B, Duncan JS, Staib LH, Duman RS, Gelernter J, Blumberg HP. Effects of the brain-derived neurotrophic growth factor val66met variation on hippocampus morphology in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2009; 34(4):944-51.
- Clark L, Iversen SD, Goodwin GM. A neuropsychological investigation of prefrontal cortex involvement in acute mania. *Am J Psychiatry.* 2001; 58(10):1605-11.
- Cochrane CG. Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med.* 1991; 12(2):137-47.
- Coppen A, Shaw DM, Malleon A, Costain R. Mineral metabolism in mania. *Br Med J.* 1966; 1(5479):71-5.
- Cowen PJ. Cortisol, serotonin and depression: all stressed out? *Br J Psychiatry.* 2002; 180:99-100.
- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet.* 2005; 42(3):193-204.

- Crema L, Schlabitz M, Tagliari B, Cunha A, Simão F, Krolow R, Pettenuzzo L, Salbego C, Vendite D, Wyse AT, Dalmaz C. Na⁺, K⁺ ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. *Neurochem Res.* 2010; 35(11):1787-95.
- Cunha AB, Frey BN, Andrezza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett.* 2006; 398(3):215-9.
- Davies JA, Jackson B, Redfern PH. The effect of amantadine, L-dopa, (plus)-amphetamine and apomorphine on the acquisition of the conditioned avoidance response. *Neuropharmacology.* 1974; 13(3):199-204.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(6):463-75.
- de Oliveira GS, Ceresér KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, Aguiar B, Pfaffenseller B, Kapczinski F. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2009; 43(14):1171-4.
- de Vasconcellos AP, Zugno AI, Dos Santos AH, Nietto FB, Crema LM, Gonçalves M, Franzon R, de Souza Wyse AT, da Rocha ER, Dalmaz C. Na⁺,K(+)-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. *Neurobiol Learn Mem.* 2005; 84(2):102-10.
- 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.
- Deckersbach T, Savage CR, Reilly-Harrington N, Clark L, Sachs G, Rauch SL. Episodic memory impairment in bipolar disorder and obsessive-compulsive disorder: the role of memory strategies. *Bipolar Disord.* 2004; 6(3):233-44.

- Derntl B, Seidel EM, Kryspin-Exner I, Hasmann A, Dobmeier M. Facial emotion recognition in patients with bipolar I and bipolar II disorder. *Br J Clin Psychol.* 2009; 48(4):363-75.
- Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial.* 2001; 14(3):193-9.
- Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2001; 78(1):108-13.
- Dinan TG. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry.* 1994; 164(3):365-71.
- Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Reisch JS, Young LT. G Protein-coupled cyclic AMP signaling in postmortem brain of subjects with mood disorders: effects of diagnosis, suicide, and treatment at the time of death. *J Neurochem.* 1999; 73(3):1121-6.
- Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature.* 1997; 386(6627):824-7.
- Dubovsky SL, Thomas M, Hijazi A, Murphy J. Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1994; 243(5):229-34.
- Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2006; 59(12):1116-27.
- Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci.* 2003; 23(19):7311-6.
- Einat H. Modelling facets of mania-new directions related to the notion of endophenotypes. *J Psychopharmacol.* 2006; 20(5):714-22.

- Einat H, Manji HK. Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2006; 59(12):1160-71.
- Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 1990; 1(6):469-490.
- El-Mallakh RS, Wyatt RJ. The Na,K-ATPase hypothesis for bipolar illness. *Biol Psychiatry*. 1995; 37(4):235-44.
- El-Mallakh RS, Schurr A, Payne RS, Li R. Ouabain induction of cycling of multiple spike responses in hippocampal slices is delayed by lithium. *J Psychiatr Res*. 2000; 34(2):115-20.
- El-Mallakh RS, El-Masri MA, Huff MO, Li XP, Decker S, Levy RS. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. *Bipolar Disord*. 2003; 5(5):362-5.
- Elshahawi HH, Essawi H, Rabie MA, Mansour M, Beshry ZA, Mansour AN. Cognitive functions among euthymic bipolar I patients after a single manic episode versus recurrent episodes. *J Affect Disord*. 2011; 130(1-2):180-91.
- Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2006a; 31(5):326-32.
- Frey BN, Andreazza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*. 2006b; 79(3):281-6.
- Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res*. 2003; 28(9):1339-44.
- Gamaro GD, Prediger ME, Lopes J, Bassani MG, Dalmaz C. Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008; 90(3):312-7.

- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 33(3):450-5.
- Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet*. 2013; 381(9878):1672-82.
- Ghaemi SN, Lenox MS, Baldessarini RJ. Effectiveness and safety of long-term antidepressant treatment in bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2001; 62(7):565-9.
- Glushchenko TS, Izvarina NL. Na⁺,K⁺-ATPase activity in neurons and glial cells of the olfactory cortex of the rat brain during the development of long-term potentiation. *Neurosci Behav Physiol*. 1997; 27(1):49-52
- Goetz I, Tohen M, Reed C, Lorenzo M, Vieta E; EMBLEM Advisory Board. Functional impairment in patients with mania: baseline results of the EMBLEM study. *Bipolar Disord*. 2007; 9(1-2):45-52.
- Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. *N Engl J Med*. 1988; 319(7):413-20.
- Goldstein I, Levy T, Galili D, Ovadia H, Yirmiya R, Rosen H, Lichtstein D. Involvement of Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Biol Psychiatry*. 2006; 60(5):491-9.
- Goodwin FK, Jamison KR. Manic-depressive illness: bipolar and recurrent unipolar disorders. 2ed. New York: Oxford University Press; 2003.
- Gould TJ, Keith RA, Bhat RV. Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine-induced open-field activity in two inbred strains of mice. *Behav Brain Res*. 2001; 118(1):95-105.
- Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004; 53(1):110-8.

Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, Streck EL, Gama CS, Kapczinski F, Kunz M. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res.* 2013; 47(10):1396-402.

Haber F, Weiss JJ. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Royal Soc London.* 1934; 147(1):332-51.

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.

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

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 1^a ed. Nova York: Oxford

Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editores. *Free radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 136-58.

Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186(1):1-85.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006; 97(6):1634-58.

Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 2003; 278(8):5557-63.

Hariri AR, Tessitore A, Mattay VS, Fera F, Weinberger DR. The amygdala response to emotional stimuli: a comparison of faces and scenes. *Neuroimage.* 2002; 17(1):317-23.

- Hennion JP, el-Masri MA, Huff MO, el-Mailakh RS. Evaluation of neuroprotection by lithium and valproic acid against ouabain-induced cell damage. *Bipolar Disord.* 2002; 4(3):201-6.
- Herman L, Hougland T, El-Mallakh RS. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007; 31(6):874-81.
- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1999; 274(32):22569-80.
- Hoertnagl CM, Muehlbacher M, Biedermann F, Yalcin N, Baumgartner S, Schwitzer G, Deisenhammer EA, Hausmann A, Kemmler G, Benecke C, Hofer A. Facial emotion recognition and its relationship to subjective and functional outcomes in remitted patients with bipolar I disorder. *Bipolar Disord.* 2011; 13(5):537-44.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24(1):677-736.
- Huang TL, Hung YY, Lee CT, Chen RF. Serum protein levels of brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin-related kinase B in bipolar disorder: effects of mood stabilizers. *Neuropsychobiology.* 2012; 65(2):65-9.
- Hyman S, Chisholm D, Kessler R, Patel V, Whiteford H. Mental disorders. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editores. *Source Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2nded. Washington: World Bank; 2006. p. 605-25.
- Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(2):145-69.
- Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Martin E, Murad F. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(10):5634-9.

- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997; 68(3):285-316.
- Jørgensen PL, Andersen JP. Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *J Membr Biol.* 1988; 103(2):95-120.
- Jørgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65(1):817-49.
- Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res.* 2010; 44(8):506-10.
- Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina F, Ferreira CL, Arent CO, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(2):162-8.
- Judd LL, Schettler PJ, Akiskal HS, Maser J, Coryell W, Solomon D, Endicott J, Keller M. Long-term symptomatic status of bipolar I vs. bipolar II disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003; 6(2):127-37.
- Juruena MF. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy Behav.* 2013; 19(13):553-2.
- Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci.* 2005; 28(1):5-11.
- Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, Kauer-Sant'anna M, Grassi-Oliveira R, Post RM. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008a; 32(4):675-92.
- Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased

- BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008b; 30(3):243-5.
- Kapczinski F, Dias VV, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M. Brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: beyond trait and state: comment on 'Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders'. *Bipolar Disord.* 2009; 11(2):221-2.
- Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Moreira JC, de Bittencourt Pasquali MA, Fries GR, Quevedo J, Gama CS, Post R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(2):156-61.
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; 10(3):381-91.
- Kato T. Mitochondrial dysfunction as the molecular basis of bipolar disorder: therapeutic implications. *CNS Drugs.* 2007; 21(1):1-11.
- Keck PE Jr. The management of acute mania. *BMJ.* 2003; 327(7422):1002-3.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry.* 2005; 62(6):593-602.
- Kim HW, Rapoport SI, Rao JS. Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Neurobiol Dis.* 2010; 37(3):596-603.
- 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.
- Kirshenbaum GS, Saltzman K, Rose B, Petersen J, Vilsen B, Roder JC. Decreased neuronal Na⁺, K⁺ -ATPase activity in *Atplα3* heterozygous

mice increases susceptibility to depression-like endophenotypes by chronic variable stress. *Genes Brain Behav.* 2011; 10(5):542-50.

Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12(12):1431-70.

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. Oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res.* 1997; 27(3):245-54.

Kunz M, Gama CS, Andrezza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(7):1677-81.

Kupka RW, Altshuler LL, Nolen WA, Suppes T, Luckenbaugh DA, Leverich GS, Frye MA, Keck PE Jr, McElroy SL, Grunze H, Post RM. Three times more days depressed than manic or hypomanic in both bipolar I and bipolar II disorder. *Bipolar Disord.* 2007; 9(5):531-5.

Kuteeva E, Hökfelt T, Wardi T, Ogren SO. Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *EXS.* 2010; 102(1):163-81.

Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem.* 1999; 274(35):24441-4.

Li R, el-Mallakh RS, Harrison L, Changaris DG, Levy RS. Lithium prevents ouabain-induced behavioral changes. Toward an animal model for manic depression. *Mol Chem Neuropathol.* 1997; 31(1):65-72.

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

- Liu L, Schulz SC, Lee S, Reutiman TJ, Fatemi SH. Hippocampal CA1 pyramidal cell size is reduced in bipolar disorder. *Cell Mol Neurobiol.* 2007; 27(3):351-8.
- Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron.* 2002; 35(4):605-23.
- Looney SW, el-Mallakh RS. Meta-analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. *Depress Anxiety.* 1997; 5(2):53-65.
- Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med.* 1998; 4(11):1241-3.
- López-Jaramillo C, Lopera-Vásquez J, Gallo A, Ospina-Duque J, Bell V, Torrent C, Martínez-Arán A, Vieta E. Effects of recurrence on the cognitive performance of patients with bipolar I disorder: implications for relapse prevention and treatment adherence. *Bipolar Disord.* 2010; 12(5):557-67.
- Macêdo DS, de Lucena DF, Queiroz AI, Cordeiro RC, Araújo MM, Sousa FC, Vasconcelos SM, Hyphantis TN, Quevedo J, McIntyre RS, Carvalho AF. Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate: relevance as an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013; 43(1):230-7.
- Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28(2):209-24.
- 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.
- Manji HK, Chen G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Mol Psychiatry.* 2002; 7(1):46-56.

- Manji HK, Chen G. Post-receptor signaling pathways in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 2000; 2(6):479-89.
- Martin AR. Quantal nature of synaptic transmission. *Physiological Reviews.* 1966; 46(1): 46:51-56.
- Martínez-Arán A, Vieta E, Colom F, Reinares M, Benabarre A, Gastó C, Salamero M. Cognitive dysfunctions in bipolar disorder: evidence of neuropsychological disturbances. *Psychother Psychosom.* 2000; 69(1):2-18.
- Martínez-Arán A, Vieta E, Colom F, Torrent C, Sánchez-Moreno J, Reinares M, Benabarre A, Goikolea JM, Brugué E, Daban C, Salamero M. Cognitive impairment in euthymic bipolar patients: implications for clinical and functional outcome. *Bipolar Disord.* 2004a; 6(3):224-32.
- Martínez-Arán A, Vieta E, Reinares M, Colom F, Torrent C, Sánchez-Moreno J, Benabarre A, Goikolea JM, Comes M, Salamero M. Cognitive function across manic or hypomanic, depressed, and euthymic states in bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 2004b; 161(2):262-70.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci.* 2008; 11(2):131-3.
- McCarren M, Alger BE. Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice: role of a Ca²⁺-dependent conductance. *J Neurophysiol.* 1987; 57(2):496-509.
- Moore K, Roberts LJ 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 1998; 28(6):659-71.
- Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Akao Y, Tanaka M. Oxidative stress in mitochondria: decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2005; 31(1):81-93.

- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 2000; 80(1):315-60.
- Noga JT, Vldar K, Torrey EF. A volumetric magnetic resonance imaging study of monozygotic twins discordant for bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2001; 106(1):25-34.
- Ongür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(22):13290-5.
- Oomen CA, Girardi CE, Cahyadi R, Verbeek EC, Krugers H, Joëls M, Lucassen PJ. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One.* 2009; 4(1): 3675-80.
- Organização Mundial de Saúde. CID-10: Classificação internacional de doenças. 1ª ed. Edusp: São Paulo; 1994.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47(1):143-83.
- Osoata GO, Yamamura S, Ito M, Vuppusetty C, Adcock IM, Barnes PJ, Ito K. Nitration of distinct tyrosine residues causes inactivation of histone deacetylase 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 384(3):366-71.
- Owens MJ, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found Symp.* 1993; 172(1):296-308.
- Paz RD, Andreasen NC, Daoud SZ, Conley R, Roberts R, Bustillo J, Perrone-Bizzozero NI. Increased expression of activity-dependent genes in cerebellar glutamatergic neurons of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2006; 163(10):1829-31.
- Pedrini M, Massuda R, Fries GR, de Bittencourt Pasquali MA, Schnorr CE, Moreira JC, Teixeira AL, Lobato MI, Walz JC, Belmonte-de-Abreu PS, Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Gama CS. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in

- patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *J Psychiatr Res.* 2012; 46(6):819-24.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977; 266(5604):730-2.
- Rao KM, Padmanabhan J, Kilby DL, Cohen HJ, Currie MS, Weinberg JB. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *J Leukoc Biol.* 1992; 51(5):496-500.
- Reich CG, Mason SE, Alger BE. Novel form of LTD induced by transient, partial inhibition of the Na,K-pump in rat hippocampal CA1 cells. *J Neurophysiol.* 2004; 91(1):239-47.
- 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.
- Robinson LJ, Ferrier IN. Evolution of cognitive impairment in bipolar disorder: a systematic review of cross-sectional evidence. *Bipolar Disord.* 2006; 8(2):103-16.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 2007; 14(1):36-46.
- Ruktanonchai DJ, El-Mallakh RS, Li R, Levy RS. Persistent hyperactivity following a single intracerebroventricular dose of ouabain. *Physiol Behav.* 1998; 63(3):403-6.
- Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Skibińska M, Hauser J. Polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and performance on a cognitive prefrontal test in bipolar patients. *Bipolar Disord.* 2003; 5(6):468-72.
- Sachs GS, Nierenberg AA, Calabrese JR, Marangell LB, Wisniewski SR, Gyulai L, Friedman ES, Bowden CL, Fossey MD, Ostacher MJ, Ketter TA, Patel J, Hauser P, Rapport D, Martinez JM, Allen MH,

- Miklowitz DJ, Otto MW, Dennehy EB, Thase ME. Effectiveness of adjunctive antidepressant treatment for bipolar depression. *N Engl J Med.* 2007; 356(17):1711-22.
- Sachs GS, Printz DJ, Kahn DA, Carpenter D, Docherty JP. The Expert Consensus Guideline Series: Medication Treatment of Bipolar Disorder 2000. *Postgrad Med.* 2000; 1-104.
- Sarkar A, Bhaduri A. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284(1):173-8.
- Schäbitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2000; 31(9):2212-7.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000; 103(2):211-25.
- Schloesser RJ, Martinowich K, Manji HK. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action.
- Shaw DM. Mineral metabolism, mania, and melancholia. *Br Med J.* 1966; 2(5508):262-7.
- Soeiro-de-Souza MG, Dias VV, Figueira ML, Forlenza OV, Gattaz WF, Zarate CA Jr, Machado-Vieira R. Translating neurotrophic and cellular plasticity: from pathophysiology to improved therapeutics for bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand.* 2012; 126(5):332-41.
- Soontornniyomkij B, Everall IP, Chana G, Tsuang MT, Achim CL, Soontornniyomkij V. Tyrosine kinase B protein expression is reduced in the cerebellum of patients with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2011; 133(3):646-54.
- 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.

- Strakowski SM, DelBello MP, Sax KW, Zimmerman ME, Shear PK, Hawkins JM, Larson ER. Brain magnetic resonance imaging of structural abnormalities in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1999; 56(3):254-60.
- Strasser HC, Lilyestrom J, Ashby ER, Honeycutt NA, Schretlen DJ, Pulver AE, Hopkins RO, Depaulo JR, Potash JB, Schweizer B, Yates KO, Kurian E, Barta PE, Pearlson GD. Hippocampal and ventricular volumes in psychotic and nonpsychotic bipolar patients compared with schizophrenia patients and community control subjects: a pilot study. *Biol Psychiatry*. 2005; 57(6):633-9.
- Suárez M, Molina S, Rivarola MA, Perassi NI. Effects of maternal deprivation on adrenal and behavioural responses in rats with anterodorsal thalamic nuclei lesions. *Life Sci*. 2002; 71(10):1125-37.
- Swayze VW 2nd, Andreasen NC, Alliger RJ, Yuh WT, Ehrhardt JC. Subcortical and temporal structures in affective disorder and schizophrenia: a magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*. 1992; 31(3):221-40.
- Thompson Ray M, Weickert CS, Wyatt E, Webster MJ. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J Psychiatry Neurosci*. 2011; 36(3):195-203.
- Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Sasaki T, Kato N, Kato T. Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci Res*. 2008; 60(2):184-91.
- Tohen M, Vieta E. Antipsychotic agents in the treatment of bipolar mania. *Bipolar Disord*. 2009; 11(2):45-54.
- Torres IJ, DeFreitas VG, DeFreitas CM, Kauer-Sant'Anna M, Bond DJ, Honer WG, Lam RW, Yatham LN. Neurocognitive functioning in patients with bipolar I disorder recently recovered from a first manic episode. *J Clin Psychiatry*. 2010; 71(9):1234-42.
- Valvassori SS, Budni J, Varela RB, Quevedo J. Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; 35(2):121-31.

- van Gorp WG, Altshuler L, Theberge DC, Mintz J. Declarative and procedural memory in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 1999; 46(4):525-31.
- Viola MS, Rodríguez de Lores Arnaiz G. Brain Na⁺, K⁺-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. *Life Sci*. 2007; 81(3):228-33.
- Vostrikov VM, Uranova NA, Orlovskaya DD. Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res*. 2007; 94(1-3):273-80.
- Wang JF, Shao L, Sun X, Young LT. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord*. 2009; 11(5):523-9.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981; 77(1):325-33.
- Wheeler MA, Stuss DT, Tulving E. Toward a theory of episodic memory: the frontal lobes and autonoetic consciousness. *Psychol Bull*. 1997; 121(3):331-54.
- Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005; 52(2):90-110.
- Wolfe J, Granholm E, Butters N, Saunders E, Janowsky D. Verbal memory deficits associated with major affective disorders: a comparison of unipolar and bipolar patients. *J Affect Disord*. 1987; 13(1):83-92.
- Wu D, Pardridge WM. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(1):254-9.
- Xia Y, Wang CZ, Liu J, Anastasio NC, Johnson KM. Brain-derived neurotrophic factor prevents phencyclidine-induced apoptosis in developing brain by parallel activation of both the ERK and PI-3K/Akt pathways. *Neuropharmacology*. 2010; 58(2):330-6.

Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci.* 2009; 12(2):113-5.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74(1):139-62.

Zarate CA Jr, Singh J, Manji HK. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2006; 59(11):1006-20.