

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

**WILSON RODRIGUES RESENDE**

**EFEITO DO LÍTIO SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO  
MANÍACO E PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS NO  
CÉREBRO E PERIFERIA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS  
À PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL**

**CRICIÚMA  
2017**



**WILSON RODRIGUES RESENDE**

**EFEITO DO LÍTIO SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO  
MANÍACO E PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS NO  
CÉREBRO E PERIFERIA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS  
À PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
para a obtenção do título de doutor em  
Ciências da saúde.

Orientador: Dr. Felipe Dal Pizzol

Coorientador: Dr. João Quevedo

Coorientadora: Dra. Samira S. Valvassori

**CRICIÚMA**

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R433e Resende, Wilson Rodrigues.

Efeito do lítio sobre o comportamento tipo maníaco e parâmetros neuroquímicos em camundongos submetidos à PSP / Wilson Rodrigues Resende ; orientador : Felipe Dal Pizzol ; coorientador: João Quevedo ; Coorientadora: Samira S. Valvassori. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.  
90 p. : il.; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

1. Transtorno bipolar - Tratamento. 2. Lítio – Uso terapêutico. 3. Citocinas. 4. Estresse oxidativo. 5. Psicose maníaco-depressiva. I. Título.

CDD. 22ª ed. 615.1





UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2003

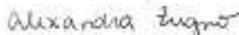
---

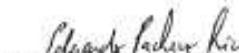
## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Wilson Rodrigues Resende** sob o título **"EFEITO DO LÍTIO SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO MANÍACO E PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E PERIFÉRICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL"**, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

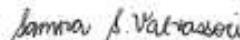
Criciúma, SC, 06 de fevereiro de 2017.

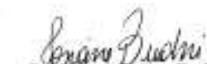
  
Prof.<sup>a</sup> Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO  
Membro Relator – UNESC

  
Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO  
Membro Interno – UNESC

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI  
Membro Externo – UNESC

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. FABRÍCIA PETRONÍLIO  
Membro Externo – UNISUL

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Samira da Silva Valvassori  
Rep. do Orientador Prof. Felipe Dal Pizzol

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Josiane Budni  
Coordenadora Adjunta do PPGCS



A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências e Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção, ambos do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UNESC.



## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus que permitiu tudo em minha vida, me dando forças para eu ir em frente. À minha família, Nair Rodrigues Resende que me foi em muitos momentos exemplo de vida e superação. Agradeço à minha esposa, Jaqueline Topanotti Resende, pelo companheirismo em todos os momentos, pela Compreensão e apoio incondicional.*

*Agradeço de modo especial à minha co-orientadora e amiga pessoal Samira da Silva Valvassori, 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 e por me ensinar, com afinco, absolutamente tudo que eu sei sobre ciência.*

*Agradeço ao Dr. João Quevedo, meu chefe e co-orientador, por me aceitar em seu laboratório e acreditar em mim. Agradeço ao meu orientador Felipe Dal Pizzol, uma pessoa diferenciada, prática e um pesquisador excepcional.*

*Agradeço aos colegas de equipe e parceiros de vida Roger Bitencourt Varela, Gustavo Colombo Dal Pont e Daniela Vicente Bavaresco por todo o carinho, ombros amigos, paciência e momentos de descontração.*

*Aos alunos de iniciação científica, e de modo especial as alunas e amigas, Fernanda Frederico Gava e Bruna Romagna Péterle, por todo o esforço, dedicação e trabalho investido, sem vocês esse trabalho não teria acontecido. Além disso, esse trabalho foi muito mais fácil com vocês!*

*Agradeço com imenso carinho a todos amigos do laboratório de neurociências e neurotoxicidade e neuroproteção, sem cada um de vocês meus dias não seriam agradáveis. Agradeço, de modo especial, a cada professor que me ajudou nessa caminhada de quatro anos, à Josiane Budni, à Alexandra Zugno (eterna Cuca), à Gislaine Zilli Réus, ao Emílio Luiz Streck.*

*Agradeço à CAPES, pelo o apoio financeiro.*

*Por fim, agradeço aos meus professores da graduação e pós-graduação, à UNESC e a todos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigado.*



## Resumo

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno psiquiátrico grave associado com comprometimento social e funcional. Alguns estudos sugerem o envolvimento do estresse oxidativo e de processos inflamatórios na fisiopatologia do TB. A privação do sono paradoxal (PSP) em camundongos tem sido considerada um bom modelo animal de mania porque induz comportamentos do tipo maníaco, bem como produz alterações neuroquímicas observadas em pacientes bipolares. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da administração de Li sobre o comportamento, parâmetros de estresse oxidativo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e níveis de citocinas na periferia e cérebro de camundongos submetidos a um modelo animal de mania induzida pela PSP. Os resultados mostraram que a PSP induziu hiperatividade em camundongos, o que é considerado um comportamento do tipo maníaco. A PSP aumentou a peroxidação lipídica e o dano oxidativo ao DNA, além de causar alterações nas enzimas antioxidantes no córtex frontal, hipocampo e soro dos camundongos. Além disso, a PSP aumentou os níveis das citocinas: interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  no cérebro dos camundongos. A PSP aumentou, também, os níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona no sangue dos animais. O tratamento com Li preveniu o comportamento maníaco, os danos oxidativos, as alterações nas citocinas e as alterações nos níveis de ACTH e corticosterona induzidas pela PSP. O aprimoramento de nosso entendimento sobre os danos oxidativos em biomoléculas, mecanismos antioxidantes e alterações do sistema inflamatório apresentadas nos modelos animais de mania são importantes para ajudar a melhorar nosso conhecimento sobre a fisiopatologia do TB e sobre os mecanismos de ação dos estabilizadores do humor.

**Palavras chave:** Transtorno bipolar; modelo animal de mania; lítio; níveis de citocinas, estresse oxidativo.



## **Abstract**

Bipolar disorder (BD) is a severe psychiatric disorder associated with social and functional impairment. Some studies have strongly suggested the involvement of oxidative stress and inflammatory process in the pathophysiology of BD. Paradoxal sleep deprivation (PSD) in mice has been considered a good animal model of mania because it induces similar manic-like behavior, as well as producing the neurochemical alterations which have been observed in bipolar patients. The goal of the present study was to investigate the effects of Li administration on behavior, oxidative stress parameters and cytokines levels in the periphery and brains of mice subjected to an animal model of mania induced by PSD. In this context, it was evaluated the parameters of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. The results showed that PSD induced hyperactivity in mice, which is considered a manic-like behavior. PSD increased lipid peroxidation and oxidative damage to DNA, as well as causing alterations to antioxidant enzymes in the frontal cortex, hippocampus and serum of mice. In addition, PSD increased the cytokine levels in brain of mouse and increased the levels of corticosterone and adrenocorticotropic hormone (ACTH). The Li treatment prevented the manic-like behavior, oxidative damage, corticosterone and ACTH increased and cytokine alterations induced by PSD. Improving our understanding relating to oxidative damage in biomolecules, antioxidant mechanisms and inflammatory system alterations presented in the animal models of mania are important in helping to improve our knowledge concerning the BD pathophysiology and action mechanisms of mood stabilizers.

**Keywords:** bipolar disorder; animal model of mania; lithium; cytokine levels, oxidative stress.



**Abreviaturas**

$^1\text{O}_2$  - Oxigênio singleto

4-HNE - 4-hidroxinonenal

8-ISO - 8-isoprostano

AChE – Acetilcolinesterase

ACTH - Adrenocorticotropic hormone

ATP – Adenosine triphosphate

$\text{Ca}^{2+}$ ATPase – Cálcio de adenosina trifosfatase

CAT - Catalase

CEUA – Comissão de Ética em Pesquisa para o Uso de Animais

CLOCK - Circadian Locomoter Output Cycles Kaput

CRF - corticotropin-releasing factor

DNA – Deoxyribonucleic Acid

DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

ERK- extracellular signal–regulated kinases

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FDA - Food and Drug Administration

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Reduced glutathione

GST - Glutathione S-transferase

$\text{H}_2\text{O}_2$ - Peróxido de hidrogênio

HHA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IL-1 - Interleucina-1

IL-10 - Interleucina-10



IL-2 - Interleucina-2

IL-4 - Interleucina-4

IL-6 - Interleucina-6

IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$

INF- $\gamma$  - Interferon- $\gamma$

Li - Lítio

LPH - lipid hydroperoxides

MDA - Malondialdehyde

NADP<sup>+</sup> - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NADPH - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase - Sódio-potássio de adenosina trifosfatase

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Ânion superóxido

OH<sup>•</sup> - Radical hidroxila

PSP - Privação do Sono Paradoxal

REM - Rapid Eye Movement

SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SOD - Superóxido dismutase

TB - Transtorno Bipolar

TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor -Alpha

VDAC - Voltage-Dependent Anion Channel



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR.....	26
1.2 FARMACOTERAPIA NO TRANSTORNO BIPOLAR .....	28
1.3 O ESTRESSE OXIDATIVO NO TRANSTORNO BIPOLAR.....	29
1.4 GLICOCORTICOIDE E EIXO HIPOTÁLAMO- HIPÓFISE-ADRENAL.....	32
1.5 TRANSTORNO BIPOLAR E INFLAMAÇÃO.....	33
1.6 RITMOS BIOLÓGICOS E TRANSTORNO BIPOLAR .....	35
1.7 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS.....	37
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	42
3.3 TRATAMENTOS .....	42
3.4 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL (PSP).....	42
3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	43
3.6 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	43



3.7 AMOSTRAS .....	44
<b>3.7.1 Soro .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7.2 Amostras de cérebro .....</b>	<b>44</b>
3.8 NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E ACTH .....	44
3.9 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS CÉREBROS DE CAMUNDONGOS..	45
<b>3.9.1 Medidas de peroxidação lipídica.....</b>	<b>45</b>
<b>3.9.2 Extração de DNA de córtex frontal e hipocampo .....</b>	<b>45</b>
<b>3.9.3 Análise de 8-OHdG .....</b>	<b>45</b>
3.10 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES ....	46
<b>3.10.1 Glutathiona peroxidase (GPx).....</b>	<b>46</b>
<b>3.10.2 Glutathiona redutase (GR) .....</b>	<b>46</b>
3.11 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-1, IL-4, IL-10 E TNF-A.....	47
3.12 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	47
3.13 ANALISE ESTATISTICA .....	47
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 TESTE COMPORTAMENTAL.....	48
4.2 NÍVEIS CIRCULANTES DE CORTICOSTERONA E ACTH.....	49
4.3 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS CÉREBROS DE CAMUNDONGOS E SORO .....	51
4.4 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS CÉREBROS E SORO DE CAMUNDONGOS .....	53



4.5 NÍVEIS DE IL-1B, IL-4, IL-10 E TNF-A NOS CÉREBROS E SORO DE CAMUNDONGOS .....	54
<b>5 Discussão.....</b>	<b>58</b>
<b>6 Conclusão.....</b>	<b>66</b>
<b>Referências .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>90</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O Transtorno Bipolar (TB) é um complexo e severo transtorno de humor com alterações progressivas nas funções social e cognitiva (Kendall et al., 2016; Miller, 2016). Apesar de, este transtorno seja caracterizado por episódios distintos de mania, hipomania e depressão, o marco clínico para o TB é o episódio maníaco e ou hipomaníaco. A característica essencial de um episódio maníaco e ou hipomaníaco é um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado, expansivo ou irritável onde o indivíduo se apresenta com aumento persistente da atividade e energia. Episódios depressivos são caracterizados por humor deprimido, diminuição do interesse ou prazer, sentimento de culpa e inutilidade e pensamentos de morte (American Psychiatric Association, 2013).

O TB é classificado basicamente em dois tipos, transtorno bipolar tipo I e tipo II. Ambos apresentam oscilação de humor, porém há diferença entre os dois tipos. No tipo I, o paciente apresenta, necessariamente, um episódio maníaco (Rise et al., 2016). No tipo II o paciente deve ter apresentado, pelo menos, um episódio hipomaníaco. O manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM) difere episódios maníacos e hipomaníacos em intensidade, duração e quantidade de sintomas. Sendo assim, um episódio maníaco deve, necessariamente, estar presente num período superior a sete dias, ou menos dias, se necessitar de internação. Quanto à intensidade dos sintomas, deve se apresentar moderada a grave e preencher mais sintomas para os critérios diagnósticos. O episódio hipomaníaco, por sua vez, deve estar presente em no mínimo quatro dias seguidos, com intensidade leve e preenchendo pelo menos três dos sintomas para os critérios diagnósticos (Montes et al., 2013; American Psychiatric Association, 2013).

Deve ser destacado o grande sofrimento tanto do paciente como também da família que acompanha esse transtorno, além disso, a taxa de suicídio apresentada por pacientes não tratados é alta, isso faz a taxa de mortalidade no transtorno ser elevada (Rosenblat et al., 2016). 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; Rosenblat et al., 2016). 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 farão uma tentativa de suicídio ao longo da vida e cerca de  $\frac{1}{4}$  morrerão por suicídio (Goodwin e Jamison, 2003).

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 apresenta 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). O transtorno bipolar (TB) é um dos mais severos transtornos e que afeta a vida de milhões de pessoas em todo o mundo. É o terceiro transtorno psiquiátrico com maior impacto na qualidade de vida do paciente, ficando atrás da depressão e transtorno obsessivo compulsivo (SUBRAMANIAM et al., 2012).

A terapia farmacológica é indispensável no tratamento dos pacientes com TB, tem função decisiva e inquestionável sendo realizada tanto aguda quanto profilaticamente, principalmente, com estabilizadores do humor. O lítio (Li) é o único estabilizador do humor aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Geddes e Miklowitz, 2013). Estudos prévios têm demonstrado que Li é efetivo em episódios maníacos e reduz significativamente as recaídas de novos episódios maníacos e depressivos (Geddes et al., 2004; Miller, 2016). Todavia, muitos pacientes têm recorrência de episódios do humor durante a vida, mesmo em uso da medicação adequada. Um estudo mostrou 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, reduzindo o intervalo entre estes e piorando o funcionamento psicossocial (Kapczinski et al., 2008).

Por fim, outro ponto com grande relevância é a significativa disfunção do ritmo circadiano que os pacientes com TB

apresentam (Bellivier et al., 2015). Estudos demonstram que indivíduos com TB apresentaram um ritmo anormal do relógio biológico, o que afeta principalmente a homeostase do sono e ritmos circadianos (Hirschfeld et al., 2010; Gonzalez, 2014). Há estudos mostrando um padrão diferente do ritmo circadiano em pessoas que desenvolveram o TB tardiamente, mesmo antes do início do transtorno. Em casos de pacientes já com TB essas alterações do ritmo circadiano são observadas em episódios agudos durante e entre os episódios (Bellivier et al., 2015). Apesar de sua importância, pouco se sabe sobre os fundamentos neurobiológicos específicos do TB. No entanto, uma quantidade considerável de estudos têm relatado o envolvimento de glicocorticóides, estresse oxidativo e citocinas inflamatórias na fisiopatologia do TB (Brown et al., 2013; Soeiro-de-Souza et al., 2013; Kim et al., 2014; Girshkin et al., 2014, Luo et al., 2016, van den Aamele et al., 2016).

## 1.2 FARMACOTERAPIA NO TRANSTORNO BIPOLAR

O tratamento farmacológico no TB está direcionado fundamentalmente à fase em que o paciente está em franco episódio - maníaco ou depressivo - para a recuperação sintomática para um estado de eutimia (Miller, 2016). Os tratamentos entre os episódios são conhecidos por tratamento de manutenção ou profilaxia e são fundamentais no TB para a prevenção de novos episódios, tanto de mania quanto de depressão, e ou para manter a continuidade da remissão. O tratamento de ambas as fases do TB é complexo, pois alguns antidepressivos podem desencadear um episódio maníaco ou hipomaníaco no paciente - fenômeno conhecido como virada maníaca. Por sua vez, os tratamentos com antimaníacos, em alguns casos, podem levar a um quadro depressivo (Geddes e Miklowitz, 2013).

Como já referido, o único fármaco aprovado especificamente para o tratamento do TB é o Li, o qual é considerado o único estabilizador do humor. Porém, outros fármacos são utilizados para o tratamento deste transtorno. Entre esses estão os anticonvulsivantes [carbamazepina, oxcarbazepina, valproato de sódio], alguns antipsicóticos típicos (haloperidol, clorpromazina) e antipsicóticos atípicos (aripiprazol, 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 (Tohen e Vieta, 2009; Bowden 2009; Haddad et al., 2009; Miller, 2016).

Ainda que tenha sido de grande valia o progresso alcançado no tratamento do TB com Li, anticonvulsivantes, antipsicóticos atípicos e antidepressivos, muitos pacientes não toleram ou respondem adequadamente a esses fármacos (Keck, 2003; 2004). Além disso, há mais de 60 anos, desde a identificação dos efeitos antimaníacos 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 (Malhi et al., 2013; Girardi et al., 2016). Uma das barreiras para o desenvolvimento de novos fármacos para o TB está associada à falta de conhecimento sobre a precisa fisiopatologia desse transtorno. Uma ferramenta importante para o estudo da neurobiologia do TB e para testes de novos fármacos são os modelos animais de transtornos psiquiátricos (Valvassori et al., 2013).

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). A maioria dos modelos animais envolvem a administração de psicoestimulantes, afim de induzir a hiperatividade e mimetizar o comportamento do tipo maníaco, uma vez que, a fase maníaca é o marco clínico do TB (Valvassori et al., 2013). É comum em pacientes, o desencadear de um episódio maníaco ser em função do uso de drogas ou fármacos, no entanto não é uma regra. Desenvolver um modelo animal, cujo o indutor seja exclusivamente ambiental é um desafio que deve ser assumido com afinco, pois esse modelo pode revelar grandes descobertas acerca desse transtorno.

### 1.3 O ESTRESSE OXIDATIVO NO TRANSTORNO BIPOLAR

Evidências, tanto clínicas quanto pré-clínicas, têm fortemente sugerido o envolvimento do estresse oxidativo no TB (Frey et al., 2006a; Halliwell, 2006; Andrezza et al., 2009; Berk et al., 2011; Jornada et al., 2011; Özerdem et al., 2016). A disfunção mitocondrial, com consequente prejuízo no metabolismo energético celular, tem sido

descrita como principal desencadeadora desse sistema (Kato, 2007; 2016). Um estado energético celular atípico 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 uma fundamental função na produção de adenosina trifosfato (ATP), através da fosforilação oxidativa. Os neurônios, assim como os músculos, apresentam superfície excitável, a qual permite a entrada de íons do meio extracelular por uma grande variedade de canais. O neurônio ao requerer grande quantidade de energia para manter o equilíbrio intracelular de íons contra o gradiente de concentração, como os processos via  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase situadas na membrana. Os processos envolvendo a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase e a  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase são os que gastam mais energia em células excitáveis (Nicholls e Budd, 2000).

Em situações em que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade de defesa antioxidante, uma condição chamada de estresse oxidativo torna as biomoléculas vulneráveis a danos, podendo levar a apoptose (Cochrane, 1991; Sigitova et al., 2016). Entre as EROs encontram-se: o oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (Yu, 1994; Halliwell e Gutteridge, 1990; Sigitova et al., 2016).

Algumas das EROs são radicais livres, enquanto outras são agentes oxidantes não radicalares, como por exemplo o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dentre as EROs, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{OH}^{\cdot}$  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; McMurray et al., 2016). O radical  $\text{OH}^{\cdot}$  é a ERO mais potente e, conseqüentemente, é o que causa maior dano nos sistemas biológicos, devido ao seu tempo de vida extremamente curto ( $1 \times 10^{-9}$ s) e de sua alta reatividade com uma grande variedade de moléculas orgânicas (Yu, 1994; McMurray et al., 2016). Além de ser produzido durante a fosforilação oxidativa, o radical  $\text{OH}^{\cdot}$  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; Galano et al., 2015).

Como proteção contra os efeitos deletérios das EROs, a célula possui algumas defesas antioxidantes capazes de atuar sobre essas substâncias tóxicas. Este sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não 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 glutaciona peroxidase (GPx), a glutaciona redutase (GR) e a glutaciona S-transferase (GST) (Chance et al., 1979; Yu, 1994). A SOD converte  $O_2^{\cdot-}$  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 glutaciona reduzida (GSH) ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). A GSH é regenerada pela GSR por intermédio da oxidação de NADPH (Imai e Nakagawa, 2003; McMurray et al., 2016; Sigitova et al., 2016).

As EROs são citotóxicas e podem também ser originadas por meio 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  $O_2^{\cdot-}$ , 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 complexo 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 convertido a  $H_2O_2$  na matriz mitocondrial pela SOD2 ou no espaço intermembrana pela SOD1 (Han et al., 2003). Os  $H_2O_2$  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.

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-hidroxinonenal (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 o 4-HNE (Halliwell e Gutteridge, 2007). Dentre os isoprostanos, o 8-ISO é um composto do tipo prostaglandina, da família F2-isoprostanos, e também é produzido pela peroxidação lipídica, derivado principalmente a partir da oxidação do ácido araquidônico (Moore e Roberts, 1998).

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 *post mortem* tem 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 glutathiona, 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).

#### 1.4 GLICOCORTICOIDE E EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é o modulador central dos sistemas de resposta ao estresse neuroendócrino de mamíferos, e, como tal, tem sido um importante foco de estudo nos transtornos psiquiátricos (Meewisse et al., 2007; de Quervain, 2008; Volko et al., 2016; Rubin de Celis et al., 2016). É bem descrito na literatura que a exposição ao estresse leva a ativação do eixo HHA em mamíferos. Em resposta ao estresse, diversos neurotransmissores, incluindo norepinefrina, acetilcolina e *gama-aminobutírico acid* (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; Rubin de Celis et al., 2016).

Várias estruturas cerebrais modulam a atividade do eixo HHA. O hipocampo e o córtex pré-frontal inibem, enquanto que a amígdala estimula a liberação de CRF pelo hipotálamo. Os glicocorticóides, os quais exercem o controle de *feedback* negativo do eixo HHA, regulam o hipocampo e os neurônios hipotalâmicos. A exposição excessiva aos glicocorticóides possui efeitos adversos sobre os neurônios do hipocampo, incluindo a redução na ramificação dendrítica, perda dos espinhos dendríticos e comprometimento da neurogênese (Brown, 2009; Wang et al., 2011; Rubin de Celis et al., 2016).

Pacientes com TB possuem níveis elevados de glicocorticóides no sangue em resposta a excessiva liberação de ACTH (Volko et al., 2016). Dados clínicos consideráveis mostraram que os glicocorticóides são um dos poucos agentes capazes de desencadear episódios depressivos e maníacos em indivíduos com TB (van Rossum et al., 2006; van West et al., 2006). Juntos, esses estudos sugerem que a ativação do eixo HHA é uma alteração fisiológica importante, vistas em pacientes com TB, podendo também ser utilizado para a avaliação de parâmetros tipo-maníacos em modelos animais de mania.

Outra questão bastante relevante acerca do envolvimento do eixo HHA, é a regulação que esse eixo faz sobre o sistema imune (Chen et al., 2016). Com o eixo HHA ativo, o sistema inflamatório é suprimido, pois o organismo necessita de toda energia focada na ação de luta ou fuga (Sapolsky, 2008). Desse modo, se faz importante analisar o sistema inflamatório em estudos de transtornos psiquiátricos.

## 1.5 TRANSTORNO BIPOLAR E INFLAMAÇÃO

O sistema inflamatório é parte da resposta imune não específica, que é ativada em resposta a estímulos nocivos, como patógenos, células danificadas (Ferrero-Miliani et al., 2007). Alguns

estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que os processos inflamatórios na periferia e no cérebro estão envolvidos na fisiopatologia do TB (Berk et al., 2011; Valvassori et al., 2015). Estudos demonstraram que os níveis séricos das citocinas: interleucina (IL) 4, IL-1 $\beta$ , IL-10 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) estão elevados em indivíduos com TB em comparação com controles saudáveis (Munkholm et al. Al., 2013, Modabbernia et al., 2013; Barbosa et al., 2014c; Rosenblat et al., 2016).

A inflamação como um mecanismo comum às doenças tem sido considerada uma importante descoberta das últimas décadas. A extensão deste achado para os transtornos neuropsiquiátricos começou a ter um grande impacto nos estudos de psiquiatria e da neurologia. Desta forma, pesquisadores e clínicos estão começando a reconhecer a importância do sistema imune e inflamatório em transtornos psiquiátricos, tais como o transtorno de humor, a ansiedade e a esquizofrenia (Miller et al., 2013).

As citocinas são peptídeos produzidos e liberados pelas células imunes com a capacidade de interferir no metabolismo de sistemas de neurotransmissores, nas atividades neuroendócrina e neuronal, na regulação do crescimento e na proliferação das células da glia (Barbosa et al., 2009). São produzidas por inúmeros tipos de células no sítio da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos. Distintos tipos de células secretam a mesma citocina, sendo que uma única citocina pode agir em diferentes tipos de células, fenômeno chamado de pleiotropia. São redundantes em suas prestações, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas (Oliveira et al., 2011). Frequentemente, são formadas em cascata, sendo que uma citocina estimula suas células alvo a produzirem mais citocinas. Essas substâncias se ligam a receptores específicos que irão ativar mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa maneira as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica. Além disso, as citocinas regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (Oliveira et al., 2011; Nassar e Azab, 2014).

As citocinas são mediadores indispensáveis para a condução da resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. Porém, uma exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias, a partir da

lesão, pode manifestar-se sistematicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Diante da impossibilidade de classificarmos as citocinas quanto à célula de origem ou quanto a sua função biológica, essas foram agrupadas em IL, numeradas na sequência de IL-1 a IL-35 (Oliveira et al., 2011; Nassar e Azab, 2014). Algumas ILs são mais estudadas nos transtornos psiquiátricos, como: IL-1, IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Dessas, algumas ILs são pró-inflamatórias (IL-1, IL-1  $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ .), enquanto outras são anti-inflamatórias (IL-2, IL-10, IL-13) (Nassar e Azab, 2014).

Um estudo mostrou que seis semanas de tratamento com Li e/ou VPA reduziu significativamente os elevados níveis de IL-6 e de seu receptor IL-6R, mas não de TNF- $\alpha$ , em pacientes com TB (Levine et al., 1999). Enquanto em outro estudo não foram observadas alterações significativas na elevação de IL-6 e IL-2 em pacientes durante episódio maníaco após duas semanas de tratamento com valproato de sódio (Stübner et al., 1999; Mc Namara e Lotrich, 2012). De acordo com Vismari e colaboradores (2008), a ativação do sistema de estresse e, conseqüentemente, do sistema nervoso simpático está ligada à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6. Também, de acordo com os mesmos autores, o processo de perda neural encontrado em áreas cerebrais específicas de pacientes deprimidos parece estar relacionado com alterações nos níveis de citocinas inflamatórias na periferia (Vismari et al., 2008). Ainda que haja evidências na literatura correlacionando o TB a alterações imunológicas, os dados ainda são inconstantes, ressaltando a importância da pesquisa nesta área (Barbosa et al., 2009).

## 1.6 RITMOS BIOLÓGICOS E TRANSTORNO BIPOLAR

É bem descrito que a ritmicidade circadiana está presente nos padrões de sono e de alimentação, de temperatura corporal, da atividade das ondas cerebrais, da produção hormonal, da regeneração celular e de diversas outras atividades biológicas (Bellivier et al., 2015). O termo circadiano vem do latim *circa* “cerca de” “*diem* “dia”, então, ritmo circadiano são ritmos que ocorrem dentro de um período de 24 horas, cerca de um dia. Para um bom funcionamento corporal e psíquico é indispensável que os padrões fisiológicos influenciados pelo ritmo circadiano estejam funcionando adequadamente. Interessantemente, do

mesmo modo que a desregulação do ciclo circadiano altera funções fisiológicas, o oposto também é verdadeiro, alterações de funções fisiológicas são capazes desregular o ciclo circadiano (Girshkin et al., 2014; Bellivier et al., 2015).

Pesquisas têm consistentemente encontrado fatores genéticos na regulação do ritmo circadiano. Além disso, fatores genéticos parecem também estar envolvidos na regulação, na expressão e no processo de fosforilação de determinadas proteínas, de enzimas e de genes, o que vêm levando os pesquisadores a sugerir que o ritmo circadiano é principalmente orquestrado de modo biológico (Dardente e Cermakian, 2007; Bellivier et al., 2015). A principal estrutura do cérebro que controla o ritmo circadiano é o núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado no hipotálamo e glândula pineal (Coyle, 2007). O NSQ é uma espécie de marca-passo circadiano, que desempenha uma complexa rede de *feedback loops* que resultam na expressão rítmica do relógio biológico. Os principais genes desse relógio são: 1) o CLOCK do inglês (circadian locomotor output cycles kaput) - BMAL1; 2) período homolog (PER), 3) CRY, 4) REV-ERB $\alpha$  (ou receptor nuclear da subfamília-1, grupo D, membro-1 [receptor nuclear órfão REV-ERB $\alpha$ ] [NR1D1]), 5) homologo à *timeless* (TIMELESS) e 6) Receptor órfão relacionado com retinóide A (RORA) (Dardente e Cermakian, 2007).

Considerando que esses genes são reguladores do ritmo circadiano, encontrar alterações nesses genes em pacientes com transtornos psiquiátricos é uma forte evidência do envolvimento de alterações circadianas nos transtornos psiquiátricos. Esse envolvimento tem sido mostrado em estudos avaliando ritmo circadiano no TB (Benedetti et al., 2008; Le-Niculescu et al., 2009; Severino et al., 2009; Lee et al., 2010; Bellivier et al., 2015). Alterações no sono e nos ritmos circadianos são encontradas em indivíduos com alto risco de desenvolvimento de TB e são observados em períodos eutímicos, prodrômicos e síndromicos (Gonzalez, 2014; Bellivier et al., 2015). Ainda, pacientes com TB, apresentam alterações do ciclo sono vigília e são mais sensíveis a qualquer mudança desse ciclo (Ankers e Jones, 2009; Geoffroy et al., 2014).

Em pacientes bipolares eutímicos, mudanças no nível de atividade diária pode indicar o surgimento de episódios depressivos, hipomaníacos e maníacos até três anos antes do surgimento do episódio

efetivamente (Shen et al., 2008). Esses achados são consistentes com a ideia de que indivíduos com TB são mais sensíveis a sinais ambientais que podem levar ou contribuir para mudanças de humor. Perturbações no sono e nas atividades diárias são os sintomas prodrômicos mais comuns quando se trata de mudança de episódios de humor (Malkoff-Schwartz et al, 1998). Nesse aspecto, é bem descrito na literatura que o ciclo sono-vigília tem um importante papel na saúde mental de um indivíduo. Pesquisas consistentes têm focado na relevância desse ciclo no TB e os resultados mostram que alterações do ciclo sono-vigília podem desencadear episódios de mania e ou hipomania, como, também, episódios de mania desregulam esse ciclo (Michelon et al., 2006).

### 1.7 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

O principal fator que limita o conhecimento sobre a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos é a complexa e desafiadora neurobiologia das funções cerebrais e as dificuldades éticas e práticas de avaliar o cérebro humano vivo (Nestler, 2010). As principais descobertas em psiquiatria biológica têm surgido a partir de achados clínicos acidentais na busca de fazer engenharia reversa. Foi explorando os efeitos biológicos dos tricíclicos, antipsicóticos e lítio que se elucidou o papel das monoaminas na depressão; o papel da dopamina na esquizofrenia; e o papel dos sistemas de segundo mensageiro no TB (Dean, 2013). Dadas as limitações das tecnologias não invasivas atuais para estudar o cérebro humano, os modelos animais de transtornos psiquiátricos são uma das ferramentas mais importantes para os estudos neurobiológicos (Nestler, 2010).

Existem três validades que devem estar presentes para um modelo animal ser considerado um bom modelo de qualquer doença, não apenas transtornos mentais. A primeira é denominada validade de face, que é a habilidade do modelo de mimetizar um ou mais sintomas presentes na clínica. A validade de constructo é a capacidade do modelo de reproduzir alterações fisiopatológicas da doença, e por último, a validade preditiva se refere à capacidade do modelo de responder aos tratamentos clássicos utilizados na prática clínica (McGonigle, 2014).

Atualmente, não existe um modelo que consiga induzir os dois polos do TB no mesmo animal; sendo assim, modelos animais de mania têm sido amplamente utilizados para estudar essa condição (Nestler, 2010). Estudos demonstraram que psicoestimulantes, como a

anfetamina, são capazes de produzir sintomas do tipo maníaco em controles saudáveis assim como induzir episódios maníacos em pacientes bipolares (Young, 2011). A partir desses resultados começou-se a estudar a administração de anfetamina como modelo de mania, e observou-se que animais submetidos a esse protocolo apresentam hiperatividade locomotora, aumento na liberação de dopamina na fenda sináptica e essas alterações são revertidas após o tratamento com Li e valproato (Frey, 2006a).

Contudo, um modelo animal de mania induzido por anfetamina, por mais que apresente as validades necessárias para um modelo animal de transtorno psiquiátrico (McGonigle, 2013), não mimetiza os aspectos ambientais relacionados ao surgimento de um episódio maníaco. Pacientes bipolares podem desenvolver episódios maníacos sob uso de substância psicoativa, todavia não é regra o desencadear de um episódio com o uso de substância. Testar um modelo animal de mania que seja totalmente ambiental é importante para a melhor compreensão da fisiopatologia do TB. Dessa forma, o modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP) se mostra um importante modelo ambiental, uma vez que não há necessidade de injetar nenhuma substância para a indução da hiperatividade nos animais (Valvassori et al., 2013).

## 1.7 SONO REM E MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL (PSP)

O cuidado que se deve ter com o tratamento de pacientes que têm histórico familiar de TB é bem conhecido, pois alguns medicamentos antidepressivos podem desencadear um episódio maníaco (Saunders e Geddes, et al., 2016). Esse fenômeno é conhecido como virada maníaca, em que um paciente eufímico entra em um episódio maníaco por uso de medicamentos ou drogas. Interessantemente, a privação do sono pode ser um elemento causador de um episódio maníaco (Colombo et al, 1999). As observações de casos de privação do sono no início dos anos 1970 forneceram a primeira evidência de que esta modalidade de tratamento é uma terapia antidepressiva não-farmacológica de ação rápida (Benedetti e Colombo, 2011).

Esse acumulado de achados foi o que permitiu o desenvolvimento do modelo animal de mania por PSP. O sono REM

(Rapid Eye Movements) é conhecido como sono paradoxal, uma vez que é o momento que se está em sono profundo, porém as ondas registradas pelo eletroencefalograma são mais semelhantes ao momento em que nos encontramos despertos. Esse paradoxo confundiu os pesquisadores a mais de 60 anos quando da descoberta do sono REM (Rasch e Born, 2013; Boyce e Adamantidis, et al., 2017). O sono dos mamíferos é dividido em quatro fases mais o sono REM. Cada fase, da primeira à quarta tem grau de profundidade distintas. A primeira fase tem sono leve e a profundidade vai aumentando até a quarta fase, quando em seguida se inicia o sono REM (Rasch e Born, 2013).

Não se sabe totalmente os mecanismos que compõe as complexas funções do sono REM no organismo, no metabolismo e na cognição. No entanto, está claro sua importância. Estudos de privação do sono REM têm apresentado resultados intrigantes, como: mudança de humor, alteração na cognição e na memória, alterações do metabolismo energético e de sistemas de neurotransmissores (Rasch e Born, 2013; Spencer, 2013; Abel et al., 2013; Boyce et al., 2016; Malvache et al., 2016). Estudos tem cada vez mais utilizado a PSP como um modelo animal de mania (Szabo et al., 2009; Armani et al., 2012; Abrial et al., 2014; Bellivier et al., 2015; Streck et al., 2015; Arent et al., 2015; Nogoceke et al., 2016). Esse modelo contém todas as validades necessárias para ser considerado um bom modelo animal em psiquiatria (Valvassori et al., 2013).

Tendo em visto todo o exposto, a PSP se apresenta como uma excelente oportunidade de avaliar parâmetros bioquímicos e comportamentais e ainda testar fármacos e novas drogas para o tratamento do TB. O presente estudo vem ao encontro dessa ideia, pois pretende avaliar o efeito do Li sobre animais submetidos à PSP.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ação do lítio sobre comportamento do tipo maníaco, alterações do eixo hipotálamo hipófise adrenal, parâmetros de estresse oxidativo e níveis de citocinas em cérebro e soro de camundongos submetidos à PSP.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a ação do lítio sobre comportamento do tipo maníaco por meio do teste de campo aberto em camundongos machos c57bl/6 submetidos ao modelo de PSP;

Avaliar a ação do lítio sobre as alterações do eixo hipotálamo hipófise adrenal através dos níveis de ACTH e corticosterona no soro de camundongos machos c57bl/6 submetidos ao modelo de PSP;

Avaliar a ação do lítio sobre as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo à lipídios e ao DNA (4-HNE; 8-ISO, 8-OHdG, GPx e GR ) no cérebro e soro de camundongos machos c57bl/6 submetidos ao modelo de PSP;

Avaliar a ação do lítio sobre as alterações nos níveis de citocinas (interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) em cérebro e soro de camundongos machos c57bl/6 submetidos ao modelo de PSP.



### 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 007/2016-1 (**em anexo**).

#### 3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos machos c57bl/6, com aproximadamente 60 dias, pesando entre 20 e 30g, 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 TRATAMENTOS

Os camundongos foram tratados diariamente por 7 dias com Salina [SAL, NaCl 0.09%, 1 ml/kg, injeção intraperitoneal (i.p)] ou Li (47.3 mg/kg, 1 ml/kg, i.p). Essas doses foram baseadas em estudos prévios do mesmo grupo de pesquisa (Valvassori et al., 2015).

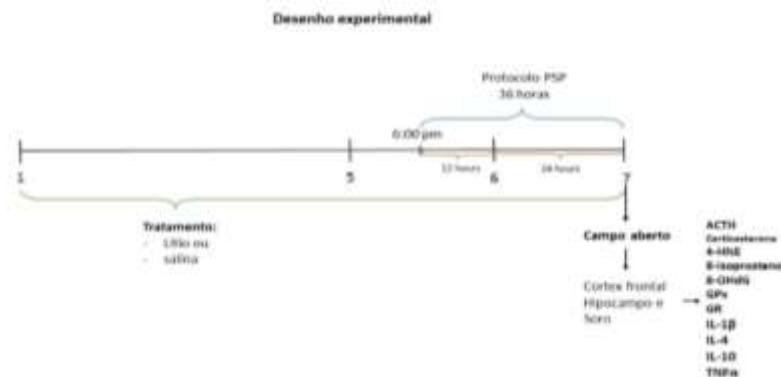
#### 3.4 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL (PSP)

O protocolo de PSP foi iniciado no quinto dia de tratamento às 6:00 da tarde (**figura 1**). Para a administração do fármaco durante o protocolo PSP, os camundongos foram removidos da plataforma e recolocados imediatamente após a injeção. No grupo privado, os camundongos foram alocados em cinco por caixa (38 x 31 x 17 cm), contendo 12 plataformas com 3,5 cm de diâmetro. Nas mesmas caixas, foi colocado um volume de água de 1 cm de profundidade, obrigando os animais a permanecerem nas plataformas. O número maior de plataformas do que de animais permitiu que eles pudessem mover-se livremente de uma plataforma para outra (Tufik et al., 2009; Armani et

al., 2012). Quando os animais entravam na fase paradoxal do sono, devido à atonia muscular, foram despertados caindo na água. A comida e a água foram disponibilizadas *ad libitum*. O presente estudo adotou o período de 36 h de PSP baseado em um estudo prévio, uma vez que este tempo de privação induziu hiperatividade em camundongos, o qual é considerado um comportamento do tipo maníaco (Armani et al., 2012). Os camundongos do grupo controle por sua vez, foram expostos ao mesmo tratamento, no entanto se mantiveram em suas caixas habitação sem água ou plataformas.

### 3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos foram randomicamente distribuídos em quatro grupos (n = 10 por grupo) como segue: (1) Controle + SAL; (2) Controle + Li; (3) PSP + SAL; (4) PSP + Li.



**Figura 1.** Desenho experimental. No primeiro dia de experimento, se deu início ao tratamento com lítio ou solução salina. No 5º dia, iniciou o protocolo de PSP às 6h pm. Após 36h, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto e, em seguida, os animais foram mortos, o sangue foi coletado e o cérebro dissecado em hipocampo e córtex frontal coletado para as avaliações bioquímicas e moleculares.

### 3.6 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.

### 3.7 AMOSTRAS

#### 3.7.1 Soro

Imediatamente após o teste comportamental, os animais foram mortos por decapitação e o sangue foi coletado em microtubos. O soro foi obtido por centrifugação a 3000 x g durante cinco minutos e depois mantido congelado a -80 °C até as avaliações bioquímicas e moleculares.

#### 3.7.2 Amostras de cérebro

Após a coleta de sangue, o cérebro dos camundongos foi removido e dissecado em córtex frontal e o hipocampo, rapidamente congelados e armazenados a -80° C até serem ensaiados. As amostras, retiradas do córtex frontal e do hipocampo dos camundongos, foram homogeneizadas em KCl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (KCl 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,038 mM, pH, = 7,4).

### 3.8 NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E ACTH

Os níveis de corticosterona foram determinados utilizando kits de imunensaio enzimático. As concentrações séricas de ACTH foram determinadas utilizando kits de radioimunoensaio comercialmente disponíveis (por Diagnostic Products Corporation, LA, EUA) para animais.

### 3.9 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS CÉREBROS DE CAMUNDONGOS

#### 3.9.1 Medidas de peroxidação lipídica

Foram analisadas duas medidas de peroxidação lipídica: 4-HNE (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, EUA; STA-338) e 8-ISO (Cayman, Item N ° 516351) seguindo as instruções do fabricante. *4-HNE*: Adutos proteicos de 4-HNE formados por modificações em lisina, histidina, ou cisteína foram quantificados através de um kit ELISA sanduíche, utilizando um ensaio imunoenzimático, de acordo com Kimura 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.

#### 3.9.2 Extração de DNA de córtex frontal e hipocampo

As amostras obtidas foram congeladas instantaneamente e armazenadas a  $-80^{\circ}$  C até o DNA ser extraído. As amostras de tecido foram submetidas a um protocolo de extração de DNA com um kit de Extração Nuclear comercial (Chemicon, EUA).

#### 3.9.3 Análise de 8-OHdG

8-OHdG é produzida pelo dano oxidativo do DNA por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e serve como um marcador estabelecido de

estresse oxidativo. As amostras de DNA foram avaliadas através de um kit de ensaio de 8-hidroxi-20-desoxi guanosina adquirido da CELL BIOLABS, INC (STA-320). É um ensaio competitivo que pode ser utilizado para a quantificação de 8-OHdG no soro e na extração de DNA do córtex frontal e do hipocampo. O kit quantifica o 8-OHdG livre e incorporado ao DNA. Este ensaio depende da competição entre 8-OHdG e 8-OHdG-acetylcholinesterase (AChE) conjugado (8-OHdG tracer) para uma quantidade limitada de 8-OHdG anticorpo monoclonal. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.10 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

#### 3.10.1 Glutationa peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi medida utilizando o kit de ensaio por Cayman Chemical. A glutaciona oxidada é produzida através da redução de peróxido de hidrogênio por GPx e é reciclada para o seu estado reduzido por GR e nicotinamida adenina dinucleotídica fosfato (NADP<sup>+</sup>). A oxidação do nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) em NADP<sup>+</sup> é seguida por uma diminuição da absorvância da luz a 340 nM. Uma unidade de GPx é definida como a quantidade de enzima que causará a oxidação de 1,0 nmol de NADPH a NADP + por minuto a 25 ° C.

#### 3.10.2 Glutationa redutase (GR)

A atividade de GR foi medida utilizando o kit de ensaio por Cayman Chemical. Através deste kit, foi possível medir a taxa de oxidação de NADPH em NADP<sup>+</sup>, que é seguido por uma diminuição na absorvância a 340 nM. Uma unidade de GR é determinada pela quantidade de enzima que causou a oxidação de 1,0 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> por minuto a 25° C.

### 3.11 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-1, IL-4, IL-10 E TNF-A

O córtex frontal, hipocampo e foram homogeneizadas em solução de extração contendo aprotinina (100 mg de tecido por 1 ml). As concentrações de citocinas foram determinadas para o soro, córtex frontal e hipocampo, utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISAs) comercialmente disponível, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, R. & D. Systems, Minneapolis, MN, EUA). Os resultados são apresentados em pg/100 mg de tecido para o hipocampo e córtex frontal. Os resultados são apresentados em pg/mL de amostra para o soro.

### 3.12 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Todas as medidas bioquímicas foram normalizadas para o teor de proteína com albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

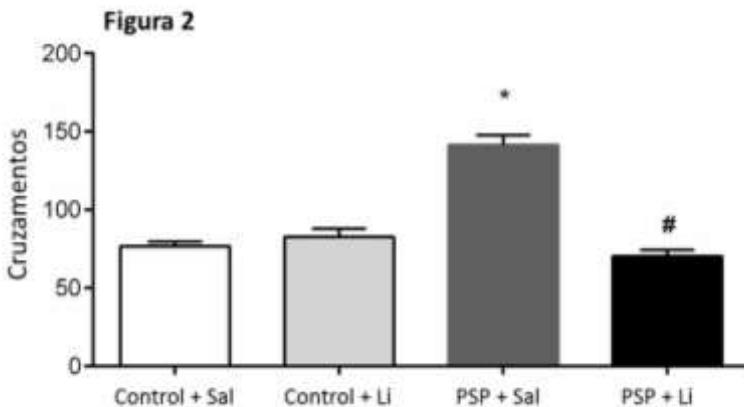
### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M. As diferenças entre grupos experimentais foram determinadas por ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Tukey.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TESTE COMPORTAMENTAL

A PSP aumentou os cruzamentos (locomoção), enquanto que a alteração na atividade locomotora foi prevenida com a administração de Li. Li sozinho não alterou as medidas comportamentais, indicando que os efeitos do estabilizador de humor em ratos submetidos a PSP não foram associados com sedação (Figura 2). O ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos de PSP [cruzamentos:  $F(1,16) = 29,74$   $p < 0,001$ ] e tratamento com Li [cruzamentos:  $F(1,16) = 46,05$ ,  $p < 0,001$ ] e uma interação significativa do tratamento com Li x PSP:  $F(1,16) = 64,56$ ,  $p < 0,001$ ].



**Figura 2.** Efeitos da PSP sobre o número de cruzamentos nos animais submetidos ao modelo animal induzido pela PSP ( $n = 10$  por grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo controle. #  $P < 0,05$  em comparação com o grupo PSP.

## 4.2 NÍVEIS CIRCULANTES DE CORTICOSTERONA E ACTH

Na **Figura 3A e 3B**, fica evidente que os níveis de ACTH e corticosterona no soro dos camundongos estão aumentados no grupo PSP, e o tratamento com Li preveniu estas alterações do eixo HHA induzidas por PSP. A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da PSP [ACTH:  $F(1,16) = 38,81$ ,  $p < 0,001$ ; Corticosterona:  $F(1,16) = 31,12$ ,  $p < 0,001$ ] e tratamento com Li [ACTH:  $F(1,16) = 37,86$ ,  $p < 0,001$ ; Corticosterona:  $F(1,16) = 33,43$ ,  $p < 0,001$ ] e uma interação significativa do tratamento com Li  $\times$  PSP [ACTH:  $F(1,16) = 80,89$ ,  $p = 0$ ; Corticosterona:  $F(1,16) = 33,31$ ,  $p < 0,001$ ].

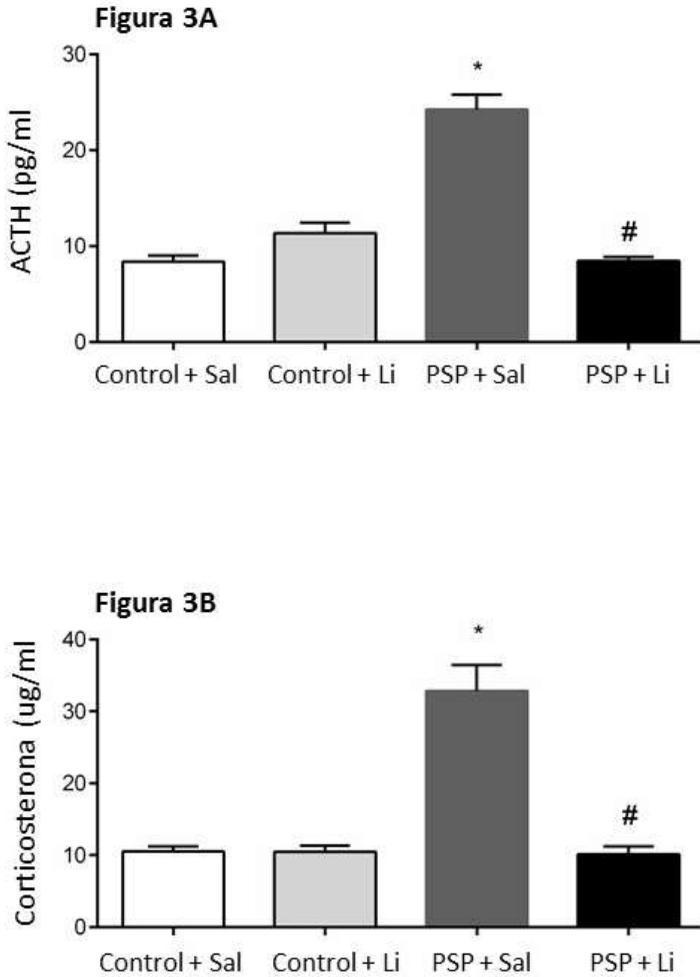
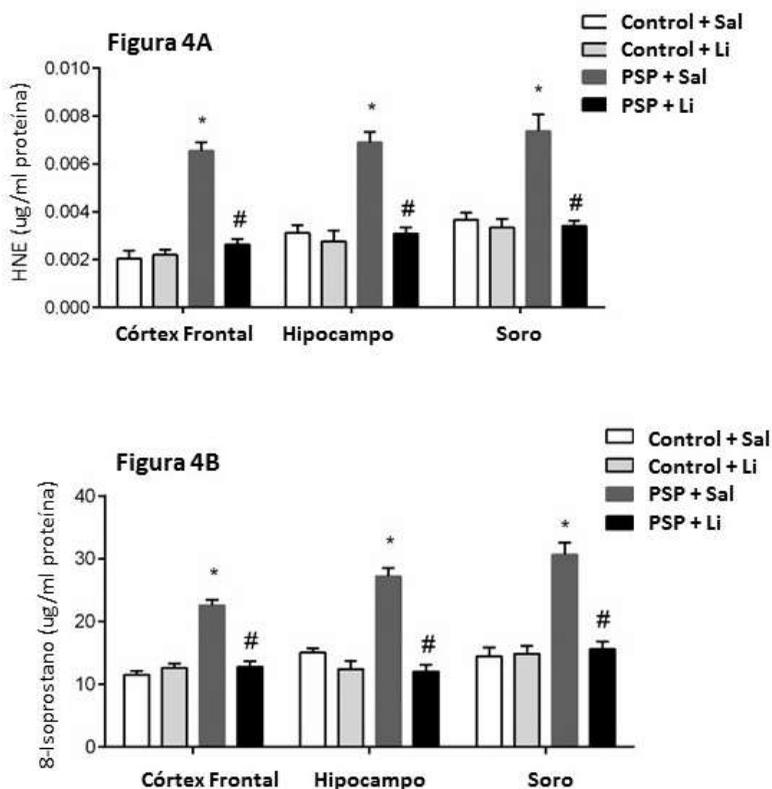


Figura 3. Efeitos da administração de lítio nos níveis de ACTH (A) e Corticosterona (B) no soro de animais submetidos ao modelo animal induzido pela PSP (n = 10 por grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. \* P < 0,05 em comparação com o grupo controle. # P < 0,05 em comparação com o grupo PSP.

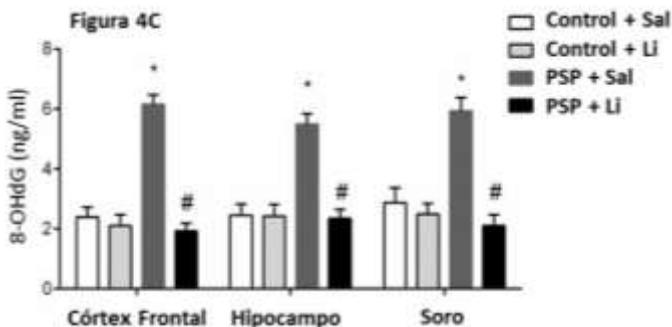
### 4.3 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS CÉREBROS DE CAMUNDONGOS E SORO

**Figuras 4A e B** mostram os parâmetros de danos oxidativos à lipídios através da avaliação dos níveis de HNE e 8-ISO nas amostras de córtex frontal, hipocampo e soro dos camundongos utilizados no estudo. A PSP induziu um aumento dos níveis de HNE e 8-ISO no córtex frontal, hipocampo e soro dos animais. A administração de Li preveniu o aumento induzido por PSP dos níveis de HNE e 8-ISO em todas as amostras analisadas. Os dados da ANOVA de duas vias na **tabela 1**.



**Figura 4 A e B.** Efeitos da administração de lítio nos níveis de HNE (A), 8-isoprostano (B) e 8-OHdG (C) no córtex frontal, hipocampo e soro de animais submetidos ao modelo animal induzido por PSP (n= 8 por grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. \* P <0,05 em comparação com o grupo controle. # P <0,05 em comparação com o grupo PSP.

A **figura 4C** mostra o dano oxidativo do DNA avaliado através da quantificação dos níveis de 8-OHdG nas amostras de córtex frontal, hipocampo e soro dos camundongos. A 8-OHdG também foi significativamente diferente entre os grupos, com aumentos significativos em camundongos submetidos a PSP, em comparação aos controles. A administração de Li previu essas alterações no DNA em todas as amostras analisadas. Os dados da ANOVA de duas vias podem

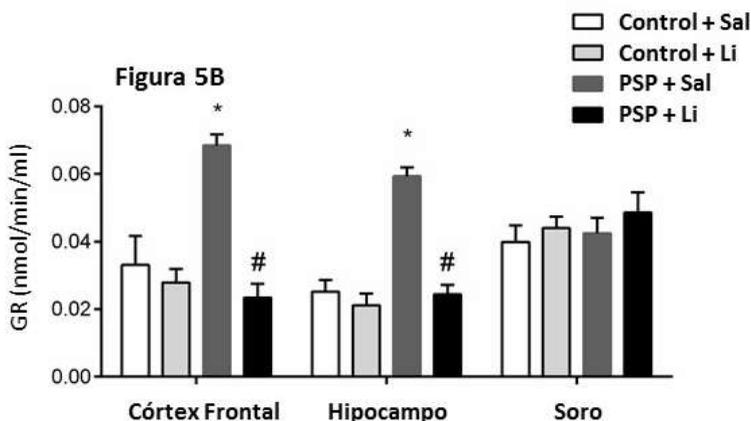
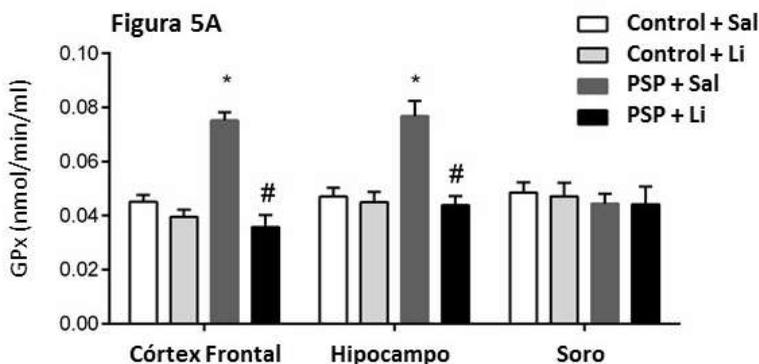


ser  
obser  
vado  
s na  
**tabel  
a 1.**

**Figura 4 C.** Efeitos da administração de lítio nos níveis de 8-OHdG (C) no córtex frontal, hipocampo e soro de animais submetidos ao modelo animal induzido por PSP (n= 8 por grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. \* P <0,05 em comparação com o grupo controle. # P <0,05 em comparação com o grupo PSP.

#### 4.4 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS CÉREBROS E SORO DE CAMUNDONGOS

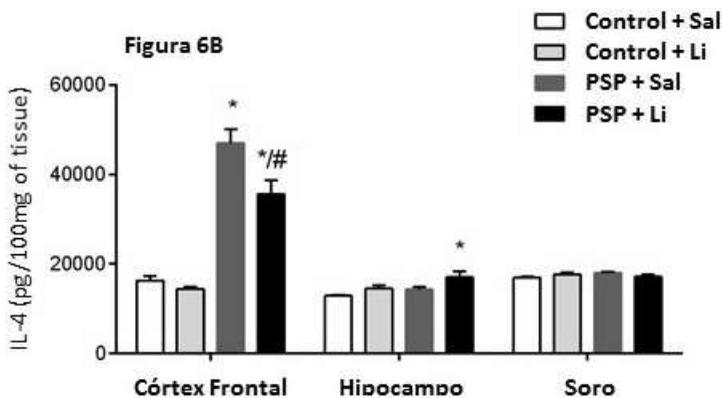
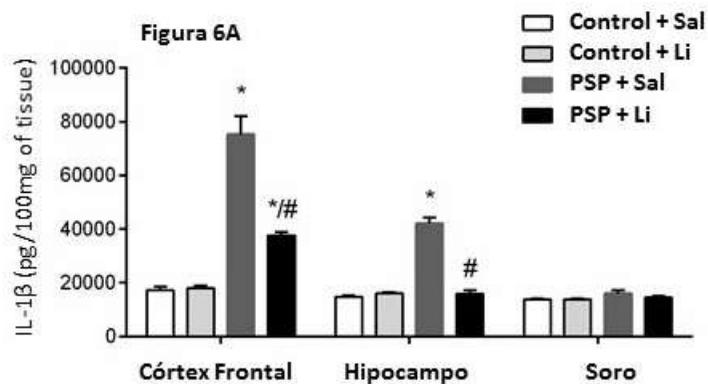
As atividades de GPx e GR no hipocampo, córtex frontal e soro dos animais são demonstradas nas **Figuras 5A** e **B**, respectivamente. A PSP aumentou a atividade de GPx no hipocampo e córtex frontal de camundongos, mas não no soro. A administração de Li preveniu essas alterações enzimáticas aumento induzidas pela PSP. Os dados do ANOVA de duas vias são apresentados na **tabela 1**.



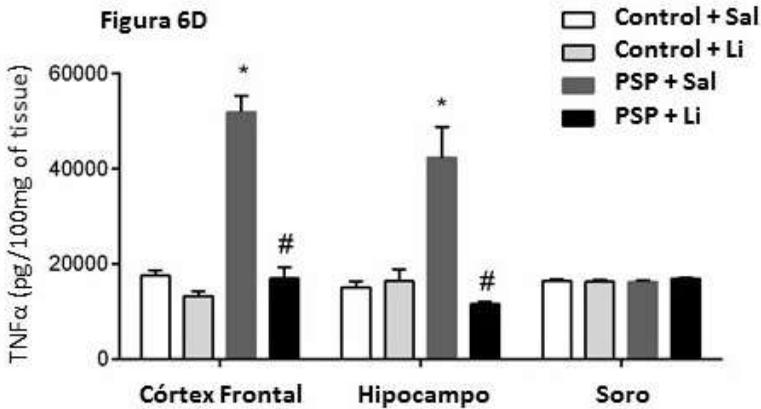
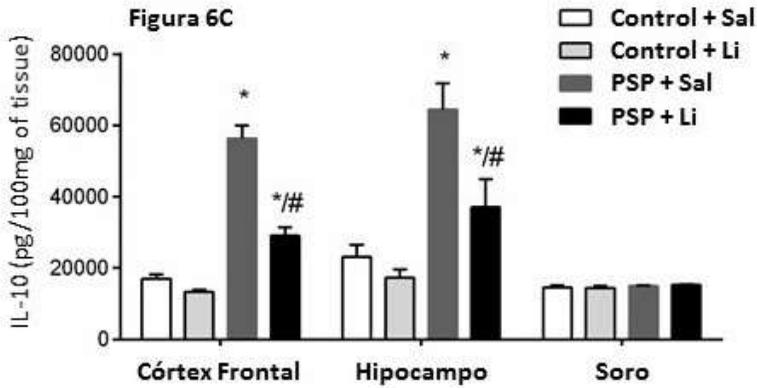
**Figura 5.** Efeitos da administração de lítio nos níveis de GPx (A) e GR (B) no córtex frontal, hipocampo e soro de animais submetidos ao modelo animal induzido por PSP (n= 8 por grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. \* P <0,05 em comparação com o grupo controle. # P <0,05 em comparação com o grupo PSP.

#### 4.5 NÍVEIS DE IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 E TNF-A NOS CÉREBROS E SORO DE CAMUNDONGOS

**Figura 6** mostra os níveis de IL-1 $\beta$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$  (D) no córtex frontal, hipocampo e soro de camundongos. A PSP aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex frontal e hipocampo. O tratamento com Li preveniu a alteração da IL-1 $\beta$  no hipocampo. O pré-tratamento com Li diminuiu significativamente o aumento induzido pela PSP dos níveis de IL-1 $\beta$  no córtex frontal, embora essa diminuição não tenha sido suficiente para atingir os níveis basais (**Figura 6A**). A PSP aumentou os níveis de IL-4 no córtex frontal, mas não no hipocampo. O pré-tratamento com Li diminuiu significativamente o aumento de IL-4 induzido pela PSP; contudo, essa diminuição não foi suficiente para atingir os níveis do grupo controle (**Figura 6B**). Além disso, a PSP aumentou os níveis de IL-10 no córtex frontal e hipocampo (**Figura 6C**), enquanto que o tratamento com Li impediu parcialmente este aumento induzido por PSP. A **Figura 6D** mostra que o PSP aumentou os níveis de IL-10 no córtex frontal e hipocampo e o tratamento com Li foi capaz de prevenir estas alterações. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de citocinas no soro. Os dados da ANOVA de duas vias são apresentados na **tabela 1**.



**Figura 6 A e B.** Efeitos da administração de lítio nos níveis de IL-1 $\beta$  (A) e IL-4 (B), no córtex frontal, hipocampo e soro de animais submetidos ao modelo animal induzido por PSP (n= 8 por grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. \* P <0,05 em comparação com o grupo controle. # P <0,05 em comparação com o grupo PSP.



**Figura 6 C e D.** Efeitos da administração de lítio nos níveis de IL-10 (C) e TNF $\alpha$  (D) no córtex frontal, hipocampo e soro de animais submetidos ao modelo animal induzido por PSP (n= 8 por grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. \* P <0,05 em comparação com o grupo controle. # P <0,05 em comparação com o grupo PSP.

**Tabela 1.** Dados do ANOVA de duas vias

Efeitos	Parâmetros de estresse oxidativo	Córtex frontal		Hipocampo		Soro	
		F(1,18)	P	F(1,16)	P	F(1,18)	P
PSP	MRE	69,86	<0,001	19,09	<0,001	18,43	<0,001
	S-O2	53,37	<0,001	26,60	<0,001	34,67	<0,001
	S-OH2	29,33	<0,001	16,89	<0,001	9,79	0,006
Li	MRE	40,57	<0,001	30,19	<0,001	23,37	<0,001
	S-O2	31,65	<0,001	60,45	<0,001	25,89	<0,001
	S-OH2	46,84	<0,001	19,54	<0,001	24,20	<0,001
Li x PSP	MRE	47,56	<0,001	20,61	<0,001	17,00	<0,001
	S-O2	49,31	<0,001	29,99	<0,001	29,07	<0,001
	S-OH2	25,55	<0,001	19,06	<0,001	16,18	<0,001
<b>Enzimas antioxidantes</b>							
PSP	GPx	16,14	<0,001	12,08	0,003	0,50	0,49
	GR	8,13	0,11	36,93	<0,001	0,58	0,467
Li	GPx	67,10	<0,001	18,13	<0,001	0,02	0,38
	GR	21,51	<0,001	29,13	<0,001	1,13	0,303
Li x PSP	GPx	26,94	<0,001	13,94	0,0018	0,01	0,50
	GR	13,48	0,002	24,58	<0,001	0,04	0,838
<b>Níveis de citocinas</b>							
PSP	IL-1β	120,98	<0,001	95,12	<0,001	4,22	0,024
	IL-4	130,31	<0,001	5,93	0,027	0,54	0,471
	IL-10	146,66	<0,001	27,92	<0,001	2,22	0,156
	TNFα	78,21	<0,001	10,38	0,005	0,28	0,618
	IL-18	27,13	<0,001	78,90	<0,001	0,73	0,40
Li	IL-4	8,53	0,0089	7,72	0,013	0,03	0,839
	IL-10	46,26	<0,001	8,21	0,011	0,048	0,829
	TNFα	80,98	<0,001	17,83	<0,001	0,50	0,48
	IL-18	29,83	<0,001	96,77	<0,001	0,96	0,34
	IL-4	4,31	0,064	0,47	0,5	3,82	0,068
Li x PSP	IL-10	26,79	<0,001	3,45	0,081	0,291	0,597
	TNFα	49,36	<0,001	21,31	<0,001	1,70	0,213

**Tabela 1.** Valores de F e P sobre os efeitos de PSP, Li e Li x PSP resultantes da análise do ANOVA de duas vias. No córtex frontal, hipocampo e soro, sobre parâmetros de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e citocinas.

## 5 DISCUSSÃO

Modelos animais de transtornos psiquiátricos, como o Transtorno Depressivo Maior (TDM) e o TB, são ferramentas de extrema importância para avaliar a neurobiologia e encontrar novos alvos para o tratamento destes transtornos. Assim, um modelo animal de transtorno psiquiátrico deve apresentar três características principais: I) habilidade do modelo em mimetizar sintomas do determinado transtorno (validade de face); II) habilidade do modelo em mimetizar características fisiopatológicas do transtorno (validade de constructo) e III) os sintomas induzidos no modelo devem ser revertidos e/ou prevenidos por fármacos clássicos, usados na clínica médica para o tratamento do determinado transtorno (validade preditiva) (Machado-Vieira et al., 2004). Então, além da avaliação comportamental, este estudo avaliou parâmetros de estresse oxidativo, do eixo HPA e os níveis de citocinas no modelo animal de mania induzido pela PSP. Além disso, foi avaliada a eficácia do tratamento com Li neste contexto.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a PSP foi capaz de induzir hiperatividade em camundongos, um comportamento considerado do tipo maníaco e o tratamento com Li preveniu essa alteração comportamental. Da mesma forma, estudos prévios, utilizando o modelo animal de mania induzido por PSP, já demonstraram as propriedades antimaniacas de Li (Armani et al., 2012; Abrial et al., 2014). Esses resultados sugerem que alterações no ritmo circadiano que levam ao comportamento do tipo maníaco nos animais, podem explicar parte das alterações dos episódios maníacos em pacientes bipolares (Roybal et al., 2007). Os episódios maníacos são caracterizados por uma diminuição acentuada na necessidade de sono. Portanto, pode-se sugerir que a PSP é uma ferramenta importante na compreensão da fisiopatologia e etiologia do TB (Berns e Nemeroff, 2003).

No presente estudo, o comportamento do tipo maníaco induzido pela PSP foi acompanhado por aumento nos níveis de corticosterona e de ACTH, o que indica que este modelo de PSP ativa o eixo HHA. De acordo com os dados do presente estudo, um estudo recente demonstrou uma concentração sérica elevada de corticosterona em ratos submetidos à PSP, quando comparado com os animais controles (Ashley et al., 2016). Corroborando com o presente estudo, vários estudos demonstraram que os níveis de corticosterona são aumentados após a PSP (Suchecki et al., 1998, Dugovic et al., 1999, Na

et al., 2016, Choi et al., 2016). Suchecki e colegas (1998) mostraram que a PSP aumentou ACTH e corticosterona em diferentes métodos de PSP. De fato, a insônia está associada ao aumento da secreção de ACTH e de cortisol e a ativação do eixo HHA ou, ainda, a administração de glicocorticóides pode levar à hiperatividade e à insônia (Opp, 1995; Chrousos et al., 2016).

Tem sido relatado desregulação do eixo HHA em pacientes bipolares (Manji e Lenox, 2000). Um estudo clínico prévio demonstrou aumento na secreção de cortisol em pacientes bipolares, sugerindo a hiperatividade do eixo HHA neste transtorno (Cervantes et al., 2001). Kim e colaboradores (2016) encontraram que os animais tratados com ACTH exibiram aumento da atividade locomotora. No mesmo estudo, Kim e colaboradores (2016) sugeriram que a administração de ACTH em ratos poderia ser um modelo animal de mania, com validade de face, mimetizando os episódios maníacos do TB. Portanto, o comportamento tipo maníaco induzido pela PSP no presente estudo pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo aumento dos níveis de ACTH também induzidos pela PSP.

É importante notar que, no presente estudo, a administração de Li preveniu o aumento de ACTH e dos níveis de corticosterona no soro de camundongos submetidos à PSP. Na literatura, os efeitos de Li sobre o eixo HHA são controversos. Alguns estudos demonstraram que a administração de Li aumentou os níveis de ACTH e de corticosterona no plasma de ratos (Hennessy et al., 1976, Smotherman, 1985, Sugawara et al., 1988, Gilmor et al., 2003, Bschor et al., 2011). Entretanto, Wood e colegas (2004) demonstraram que 36 dias de tratamento com Li não alteraram significativamente os níveis de corticosterona. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que as metodologias e o tempo de tratamento com Li foram diferentes nos estudos. É importante ressaltar que, no presente estudo, Li *per se* não alterou os níveis de corticosterona e de ACTH. Nesse estudo, os efeitos de Li foram sobre as alterações no eixo HHA induzidas pela PSP. É bem descrito na literatura que Li atua sobre mecanismos de ritmos circadianos (McCarthy et al., 2011, Moreira e Geoffroy, 2016). Um estudo pré-clínico demonstrou que Li atrasa os ritmos circadianos bioquímicos em ratos. Neste estudo, os autores mostraram que a prolactina plasmática, corticosterona e aldosterona, apresentaram atrasos nos seus ritmos circadianos nos ratos tratados com Li (McEachron et al., 1982). Portanto, pode-se sugerir que Li regula indiretamente os níveis

de corticosterona e de ACTH dos camundongos submetidos à PSP, atuando sobre mecanismos de ritmos circadianos.

Alguns estudos demonstraram que os glicocorticóides liberados pela glândula adrenal em resposta à ativação induzida pelo estresse do eixo HHA podem induzir estresse oxidativo (Spiers et al., 2015). Muitas vezes, demonstrou-se que a PSP aumentou o dano oxidativo aos lipídios (4-HNE e 8-ISO) e ao DNA (8-OHdG) no córtex frontal, hipocampo e soro dos camundongos. Estudos anteriores mostraram que a PSP aumentou os parâmetros de dano oxidativo aos lipídios, como: hidroperóxido de lipídio, 4-HNE e malondialdeído no córtex frontal e hipocampo de ratos (Zhang et al., 2013; Arent et al., 2015). De acordo com o estudo de Vollert et al., (2011) também demonstraram que o aumento da corticosterona sérica foi acompanhado por marcadores de peroxidação lipídica (8-ISO e malondialdeído) aumentados no hipocampo, córtex e amígdala de ratos submetidos ao PSP. Existem evidências que sugerem uma importante ligação entre o estado redox e o ritmo circadiano (Wang et al., 2012, Fanjul-Moles e López-Riquelme, 2016). Wang e colaboradores (2012) mostraram alterações de sistemas redox em camundongos mutantes com deleção ou interrupção de genes CLOCK. O ritmo circadiano tem uma oscilação natural no estado redox, em que as enzimas antioxidantes e as EROs são produzidas dependendo da hora do dia, controlada por um relógio biológico (Wang et al., 2012). Assim, pode-se sugerir que a PSP, que interrompe a oscilação do ritmo circadiano, pode estar desregulando o estado redox gerando estresse oxidativo.

O dano oxidativo aos lípidos e ao DNA também tem sido observado em pacientes bipolares, tanto no cérebro quanto no soro (Andreazza et al., 2013; Soeiro-de-Souza et al., 2013; Versace et al., 2014). Os níveis de 8-ISO e de 4-HNE foram encontrados aumentados no córtex pré-frontal pós-morte de pacientes com TB, quando comparado com controles saudáveis (Andreazza et al., 2013). Além disso, uma pesquisa clínica também demonstrou elevadas medidas séricas de peroxidação lipídica em pacientes bipolares (Versace et al., 2014). Curiosamente, Versace e colaboradores (2014) demonstraram uma relação entre o dano da substância branca e a peroxidação lipídica periférica em pacientes bipolares. Além disso, estudos anteriores demonstraram que os níveis de 8-OHdG foram mais elevados em pacientes com TB em comparação com controles saudáveis (Soeiro-de-Souza et al., 2013). Juntos, esses estudos sugerem o papel da

peroxidação lipídica e da oxidação do DNA no TB. Considerando que a PSP também induz aumento no marcador de peroxidação lipídica e oxidação do DNA; o comportamento tipo maníaco induzido pela PSP pode ser um modelo animal útil para testar a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo no TB.

Nossos resultados mostraram que o Li foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica e a oxidação do DNA no cérebro e no soro dos camundongos submetidos a PSP. Estudos pré-clínicos prévios, usando outros modelos animais de mania, demonstraram os efeitos antioxidantes de Li. Valvassori e colegas (2015) descobriram que Li modula as enzimas antioxidantes, prevenindo o comportamento do tipo maníaco e os danos oxidativos no cérebro dos ratos submetidos a um modelo de mania induzido pela ouabaína. Li também reverteu o dano oxidativo no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzida por anfetamina (da-Rosa et al., 2011). Além disso, em um modelo animal de sepsis o tratamento com Li nas doses 25 e 50 mg/kg diminuiu os níveis de 8-ISO (Albayrak et al., 2013). Juntamente com esses resultados prévios, os presentes dados sugerem que Li tem propriedades antioxidantes, protegendo o cérebro contra lesões oxidativas cerebrais.

No presente estudo as atividades da GPx e da GR foram aumentadas no córtex frontal e hipocampo de camundongos após a PSP. O tratamento com Li, por sua vez, impediu as alterações dessas enzimas. De acordo com nossos dados, estudos anteriores demonstraram que a PSP induz alterações nos níveis de GPx e GR no cérebro de camundongos (Arent et al., 2015). Um estudo avaliou a ação da glutatona em diferentes momentos do ciclo circadiano. Observou-se que o pico da atividade da glutatona é no início da noite, indicando um estado oxidado de glutatona, enquanto que a atividade da glutatona foi menor no meio do dia, indicando um estado relativamente reduzido (Wang et al., 2012). Assim, pode-se sugerir que a PSP, que interrompe a oscilação do ritmo circadiano, pode estar desregulando o ciclo de glutatilação e, conseqüentemente, alterando a atividade da glutatona.

Não foram encontradas, no estudo, alterações das enzimas antioxidantes, GPx e GR no soro dos camundongos submetidos a PSP. Não foram encontrados outros artigos na literatura que avaliasse esses parâmetros no soro de animais submetidos à PSP. Andrezza e colegas (2009) evidenciaram um aumento de glutatona S transferase e de GR,

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). É importante ressaltar que a privação do sono aconteceu durante 36h e, talvez, uma possível explicação para não serem observadas essas alterações na periferia é que essas alterações podem ter ocorrido inicialmente no sistema nervoso central. Portanto, estudos em animais submetidos à PSP em vários momentos da vida podem ajudar a elucidar os efeitos da PSP na periferia.

Li preveniu o aumento da atividade de GPx e da GR induzidas pela PSP, no córtex frontal e hipocampo de camundongos. Brocardo e colaboradores (2010) demonstraram que Li modula GPx e GR, protegendo o cérebro contra o dano oxidativo induzido pela ouabaína em um modelo animal de mania. Além disso, um estudo prévio mostrou que Li modula outras enzimas antioxidantes, como a SOD e CAT, e previne danos oxidativos induzidos pela ouabaína no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a esse modelo animal de mania (Jornada et al. 2011). Em um estudo pré-clínico, utilizando o modelo animal de mania induzido pelo metilfenidato, demonstrou-se que os ratos induzidos ao comportamento do tipo maníaco, apresentaram diminuição nos níveis de glutatona reduzida e na atividade de GPx, e essas alterações foram revertidas pelo tratamento com Li (Arunagiri et al., 2014). Juntos, esses dados sugerem que Li pode modular enzimas antioxidantes, protegendo o cérebro contra danos oxidativos.

Sabe-se que o estresse oxidativo é um importante fator etiológico na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, como a aterosclerose, distúrbios metabólicos e câncer (Chen e Nuñez, 2010). Há uma quantidade crescente de dados que mostram que a perda de sono tem sido associada com alterações no eixo HHA, ativação de parâmetros inflamatórios e aumento dos parâmetros de estresse oxidativo em humanos e em modelos animais (Irwin et al., 1996; Ritter et al., 2013; Arent et al., 2015; Ashley et al., 2016). De fato, o presente estudo mostrou que a alteração do eixo HHA e o estresse oxidativo foram acompanhados pelo aumento do nível de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  no cérebro de camundongos submetidos à PSP. Em acordo com o presente estudo, Ashley e colaboradores (2016) demonstraram que camundongos submetidos à PSP exibiram uma expressão gênica pró-inflamatória

aumentada de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no hipotálamo, hipocampo e córtex frontal. Num estudo anterior, utilizando o modelo animal de mania induzido por anfetamina, foi demonstrado que IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  estavam aumentados no cérebro de ratos com comportamento do tipo maníaco (Valvassori et al. 2015). Alguns estudos clínicos demonstraram que os processos neuropatológicos progressivos com o TB estão ligados a alterações de citocinas inflamatórias (Kapczinski et al., 2009; Berk et al., 2011). Um estudo clínico demonstrou que as alterações observadas no sono dos pacientes com TB também estão relacionadas com a elevação da IL-6 (Ritter et al., 2013). Juntos com os resultados do presente estudo, esses estudos, citados anteriormente, sugerem que a privação do sono e comportamentos maníacos estão associados à alteração do sistema inflamatório.

Não foram encontradas alterações no soro dos camundongos submetidos à PSP. Um estudo prévio deste grupo de pesquisa mostrou que a administração de anfetamina em ratos, considerado um modelo animal de mania, aumentou os níveis de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no soro desses animais (Valvassori et al., 2015). Além disso, a maioria dos estudos, avaliando citocinas em pacientes com TB, avaliam os níveis dessas moléculas no sangue dos pacientes (Barbosa et al., 2014a; Barbosa et al., 2014b; Li et al., 2014; Bai et al., 2014; Monfrim et al., 2014; Wieck et al., 2014; Munkholm et al., 2015). Cabe ser citada aqui a explicação dada anteriormente. Os animais do presente estudo foram submetidos a um tempo curto de PSP, apenas 36h e, talvez, nesse período pode ser observada poucas alterações na periferia. A partir desses resultados, pode ser reforçada, novamente, a necessidade de mais estudos utilizando o modelo de PSP para melhor elucidar os efeitos da privação do sono sobre as alterações do sistema inflamatório na periferia.

Ainda, Li preveniu as alterações das citocinas induzidas pela PSP. Um estudo prévio do nosso laboratório de pesquisa demonstrou que Li reverteu as alterações das citocinas no córtex frontal e estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzida por anfetamina (Valvassori et al., 2015). Curiosamente, Li apresentou efeitos anti-inflamatórios em um modelo animal de sepse (Albayrak et al., 2013). É bem descrito na literatura os efeitos anti-inflamatórios de Li, tais como a supressão da expressão da ciclooxigenase-2, a inibição da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e o aumento da síntese de IL-2 e IL-10

(Arena et al. , 1997, Nahman et al., 2012, Wang et al., 2013). Um estudo clínico demonstrou que as concentrações de citocinas em pacientes em remissão tratados com Li não foram diferentes de indivíduos saudáveis, sugerindo que o tratamento de manutenção com Li faz com que o status das citocinas atinja um nível semelhante ao dos indivíduos controle saudáveis (Remlinger-Molenda et al., 2012). Conforme demonstrado anteriormente, Li previne o dano oxidativo aos lipídeos e ao DNA em ratos submetidos à PSP. Como a produção excessiva de ROS induzida por PSP pode levar à inflamação, Li pode modular sistemas antioxidante e modular indiretamente os níveis de citocinas.

Por fim, os dados do presente estudo demonstraram que a PSP induz alterações do eixo HHA, aumento dos níveis de citocinas e de parâmetros de estresse oxidativo. Portanto, pode-se sugerir que as alterações dos ritmos circadianos observadas no TB podem estar relacionadas à alteração do eixo HHA, ativação do sistema inflamatório e estresse oxidativo; todos esses parâmetros também são observados neste transtorno. Além disso, Li preveniu as alterações neuroquímicas induzidas pelo PSP, sugerindo que este estabilizador de humor pode atuar sobre mecanismos dos ritmos circadianos, protegendo o sistema nervoso central e a periferia contra alteração do eixo HHA, estresse oxidativo e aumento dos níveis de citocinas. Contudo, um direcionamento futuro certo, será a mensuração de parâmetro cognitivos e de memória sobre a PSP, isso por que alterações cognitivas, de memória e aprendizado estão presentes em pacientes com TB. Por tanto, verificar a presença de alterações nesses parâmetros tornará esse modelo mais refinado.



## 6 CONCLUSÃO

A PSP induz alterações do eixo HHA, aumento dos níveis de citocinas e de parâmetros de estresse oxidativo. Portanto, pode-se sugerir que as alterações dos ritmos circadianos observadas no TB podem estar relacionadas à alteração do eixo HHA, ativação do sistema inflamatório e estresse oxidativo; todos esses parâmetros também são observados neste transtorno. Além disso, Li preveniu as alterações neuroquímicas induzidas pelo PSP, sugerindo que este estabilizador de humor pode atuar sobre mecanismos dos ritmos circadianos, protegendo o sistema nervoso central e a periferia contra alteração do eixo HHA, estresse oxidativo e aumento dos níveis de citocinas. Não obstante, um direcionamento futuro certo, será a mensuração de parâmetro cognitivos e de memória sobre a PSP, isso por que alterações cognitivas, de memória e aprendizado estão presentes em pacientes com TB.



**REFERÊNCIAS**

Abel T, Havekes R, Saletin JM, Walker MP. Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks. *Curr Biol*. 2013 Sep 9;23(17):R774-88.

Abrial E, Bétourné A, Etiévant A, Lucas G, Scarna H, Lambás-Señas L, Haddjeri N. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Oct 31;18(2). pii: pyu031.

Albayrak A, Halici Z, Polat B, Karakus E, Cadirci E, Bayir Y, Kunak S, Karcioglu SS, Yigit S, Unal D, Atamanalp SS. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and anti-inflammatory effects in an animal model of sepsis. *Int Immunopharmacol*. 2013 May;16(1):35-40.

American Psychiatric Association. *DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. 1ª ed. Porto Alegre:Artmed; 2013.

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.

Ankers D, Jones SH. Objective assessment of circadian activity and sleep patterns in individuals at behavioural risk of hypomania. *J Clin Psychol*. 2009 Oct;65(10):1071-86.

Arena A, Capozza AB, Orlando ME, Currò F, Losi E, Chillemi S, Mesiti M, Merendino RA. In vitro effects of lithium chloride on TNF alpha and IL-6 production by monocytes from breast cancer patients. *J Chemother* 1997; 9: 219–226.

Arent CO, Valvassori SS, Steckert, Resende WR, Dal-Pont GC, Lopes-Borges J, Amboni RT, Bianchini G, Quevedo J. The effects of n-acetylcysteine and/or deferoxamine on manic-like behavior and brain oxidative damage in mice submitted to the paradoxal sleep deprivation model of mania. *J Psychiatr Res*. 2015 Jun;65:71-9.

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

Arunagiri P, Rajeshwaran K, Shanthakumar J, Tamilselvan T, Balamurugan E. Combination of omega-3 Fatty acids, lithium, and aripiprazole reduces oxidative stress in brain of mice with mania. *Biol Trace Elem Res*. 2014;160(3):409-17.

Ashley NT, Sams DW, Brown AC, Dumaine JE. Novel environment influences the effect of paradoxical sleep deprivation upon brain and peripheral cytokine gene expression. *Neurosci Lett*. 2016 Feb 26;615:55-9.

Bai YM, Su TP, Li CT, Tsai SJ, Chen MH, Tu PC, Chiou WF. Comparison of pro-inflammatory cytokines among patients with bipolar disorder and unipolar depression and normal controls. *Bipolar Disord*. 2015 May;17(3):269-77.

Bai YM, Su TP, Tsai SJ, Wen-Fei C, Li CT, Pei-Chi T, Mu-Hong C. Comparison of inflammatory cytokine levels among type I/type II and manic/ hypomanic/ euthymic/ depressive states of bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2014 Sep;166:187-92.

Barbosa A, Naniche D, Aponte JJ, Manaca MN, Mandomando I, Aide P, Sacarlal J, Renom M, Lafuente S, Ballou WR, Alonso PL. Plasmodium falciparum-specific cellular immune responses after

immunization with the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in an area of high endemicity in Mozambique. *Infect Immun.* 2009 Oct;77(10):4502-9.

Barbosa IG, Bauer ME, Machado-Vieira R, Teixeira AL. Cytokines in bipolar disorder: paving the way for neuroprogression. *Neural Plast.* 2014a;2014:360481.

Barbosa IG, Morato IB, de Miranda AS, Bauer ME, Soares JC, Teixeira AL. A preliminary report of increased plasma levels of IL-33 in bipolar disorder: further evidence of pro-inflammatory status. *J Affect Disord.* 2014b Mar;157:41-4.

Barbosa IG, Rocha NP, Assis F, Vieira ÉL, Soares JC, Bauer ME, Teixeira AL. Monocyte and lymphocyte activation in bipolar disorder: a new piece in the puzzle of immune dysfunction in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014c Oct 31;18(1). pii: pyu021.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271(5):1424-37.

Bellivier F, Geoffroy PA, Etain B, Scott J. Sleep- and circadian rhythm-associated pathways as therapeutic targets in bipolar disorder. *Expert Opin Ther Targets.* 2015 Jun;19(6):747-63.

Benedetti F, Colombo C. Sleep deprivation in mood disorders. *Neuropsychobiology.* 2011; 64:141–151.

Benedetti F, Dallaspezia S, Colombo C, Pirovano A, Marino E, Smeraldi E. A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* influences age at onset of bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2008 Nov 14;445(2):184-7.

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.

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

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.

Boyce R, Adamantidis A. REM Sleep on It! *Neuropsychopharmacology.* 2017 Jan;42(1):375.

Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science.* 2016 May 13;352(6287):812-6.

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 Jun;12(4):414-24.

Brown ES. Effects of glucocorticoids on mood, memory, and the hippocampus. Treatment and preventive therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Oct;1179:41-55.

Brown ES. Effects of glucocorticoids on mood, memory, and the hippocampus. Treatment and preventive therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Oct;1179:41-55.

Bschor T, Ritter D, Winkelmann P, Erbe S, Uhr M, Ising M, Lewitzka U. Lithium monotherapy increases ACTH and cortisol response in the DEX/CRH test in unipolar depressed subjects. A study with 30 treatment-naive patients. *PLoS One.* 2011;6(11):e27613.

Cervantes P, Gelber S, Kin FN, Nair VN, Schwartz G. Circadian secretion of cortisol in bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2001 Nov;26(5):411-6.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527-605.

Chen AL, Sun X, Wang W, Liu JF, Zeng X, Qiu JF, Liu XJ, Wang Y. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis contributes to the immunosuppression of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *J Neuroinflammation.* 2016 Oct 12;13(1):266.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010 Dec;10(12):826-37.

Choi JH, Lee SH, Bae JH, Shim JS, Park HS, Kim YS, Shin C. Effect of Sleep Deprivation on the Male Reproductive System in Rats. *J Korean Med Sci.* 2016 Oct;31(10):1624-30.

Chrousos , Vgontzas AN, Kritikou I. HPA Axis and Sleep. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *SourceEndotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.2016 Jan 18.

Cochrane CG. Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med.* 1991; 12(2):137-47.

Colombo C, Benedetti F, Barbini B, Campori E, Smeraldi E. Rate of switch from depression into mania after therapeutic sleep deprivation in bipolar depression. *Psychiatry Res.* 1999 Jun 30;86(3):267-70.

Cowen PJ. Cortisol, serotonin and depression: all stressed out? *Br J Psychiatry.* 2002; 180:99-100.

Coyle JT. What can a clock mutation in mice tell us about bipolar disorder? *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(15):6097-8

Dardente H, Cermakian N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int.* 2007;24(2):195-213.

da-Rosa DD, Valvassori SS, Steckert AV, Ornell F, Ferreira CL, Lopes-Borges J, Varela RB, Dal-Pizzol F, Andersen ML, Quevedo J. Effects of

lithium and valproate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of m-AMPH. *Psychiatry Res.* 2012 Aug 15;198(3):521-6.

de Quervain DJ. Glucocorticoid-induced reduction of traumatic memories: implications for the treatment of PTSD. *Prog Brain Res.* 2008; 167:239-47.

Dean B, Gibbons AS, Tawadros N, Brooks L, Everall IP, Scarr E. Different changes in cortical tumor necrosis factor- $\alpha$ -related pathways in schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry.* 2013 Jul;18(7):767-73.

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.

Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci.* 1999 Oct 1;19(19):8656-64.

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.

Fanjul-Moles ML, López-Riquelme GO. Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7420637.

Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clin Exp Immunol.* 2007 Feb;147(2):227-35.

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*. 2006;31(5):326-32.

Galano A, Medina ME, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis. *J Pineal Res*. 2015 Jan;58(1):107-16.

Geddes JR, Burgess S, Hawton K, Jamison K, Goodwin GM. Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Psychiatry*. 2004 Feb;161(2):217-22.

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

Geoffroy PA, Boudebessé C, Bellivier F, Lajnef M, Henry C, Leboyer M, Scott J, Etain B. Sleep in remitted bipolar disorder: a naturalistic case-control study using actigraphy. *J Affect Disord*. 2014 Apr;158:1-7.

Gilmor ML, Skelton KH, Nemeroff CB, Owens MJ. The effects of chronic treatment with the mood stabilizers valproic acid and lithium on corticotropin-releasing factor neuronal systems. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 May;305(2):434-9.

Girardi P, Brugnoli R, Manfredi G, Sani G. Lithium in Bipolar Disorder: Optimizing Therapy Using Prolonged-Release Formulations. *Drugs R D*. 2016 Dec;16(4):293-302.

Girshkin L, Matheson SL, Shepherd AM, Green MJ. Morning cortisol levels in schizophrenia and bipolar disorder: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Nov;49:187-206.

Girshkin L, Matheson SL, Shepherd AM, Green MJ. Morning cortisol levels in schizophrenia and bipolar disorder: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Nov;49:187-206.

Gonzalez R. The relationship between bipolar disorder and biological rhythms. *J Clin Psychiatry*. 2014 Apr;75(4):e323-31.

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

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.

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

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

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.

Hennessy JW, Smotherman WP, Levine S. Conditioned taste aversion and the pituitary-adrenal system. *Behav Biol.* 1976 Apr;16(4):413-24. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;443:126-44.

Hirschfeld RMA, Bowden CL, Gitlin MJ, Keck PE, Suppes T, Thase ME, Wagner KD, Perlis RH. Practice guideline for the treatment of patients with bipolar disorder. 2nd edition. American Psychiatric Association; 2010.

Hyman, S.; Chisholm, D.; Kessler, R.; Patel, V.; Whiteford, H. Mental Disorders. In: Jamison, D.T.; Breman, J.G.; Measham, A.R.; Alleyne, G.; Claeson, M.; Evans, D.B.; Jha, P.; Mills, A.; Musgrove, P., editores. *Source Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2<sup>a</sup>ed. 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 Jan 15;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.

Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J, Gillin JC. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *FASEB J.* 1996;10:643-3.

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.

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.

Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M et al. The potential use of biomarkers as an adjunctive tool for staging bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33: 1366–1371.

Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, Kauer-Sant'anna M, Grassi-Oliveira R, Post RM. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(4):675-92.

Kato T. Neurobiological basis of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction hypothesis and beyond. *Schizophr Res*. 2016 Nov 10. pii: S0920-9964(16)30481-9.

Kato T. Mitochondrial dysfunction as the molecular basis of bipolar disorder: therapeutic implications. *CNS Drugs*. 2007;21(1):1-11.

Keck PE Jr. Defining and improving response to treatment in patients with bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2004; 65 Suppl 15:25-9.

Keck PE Jr. The management of acute mania. *BMJ*. 2003;327(7422):1002-3.

Kendall T, Morriss R, Mayo-Wilson E, Meyer TD, Jones SH, Oud M, Baker MR. NICE guidance on psychological treatments for bipolar disorder. *Lancet Psychiatry*. 2016 Apr;3(4):317-20.

Kessler, R.C.; Berglund, P.; Demler, O.; J.I.N.R.; Merikangas, K.R.; Walters, E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 62(6): 593-602. 2005.

Kim HK, Andreazza AC, Yeung PY, Isaacs-Trepanier C, Young LT. Oxidation and nitration in dopaminergic areas of the prefrontal cortex from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*. 2014 Jul;39(4):276-85.

Kim HK, Andreazza AC, Yeung PY, Isaacs-Trepanier C, Young LT. Oxidation and nitration in dopaminergic areas of the prefrontal cortex

from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci.* 2014 Jul;39(4):276-85.

Kim Y, McGee S, Czczor JK, Walker AJ, Kale RP, Kouzani AZ, Walder K, Berk M, Tye SJ. Nucleus accumbens deep-brain stimulation efficacy in ACTH-pretreated rats: alterations in mitochondrial function relate to antidepressant-like effects. *Transl Psychiatry.* 2016 Jun 21;6(6):e842.

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.

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, Andreatza 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.

Lee KY, Song JY, Kim SH, Kim SC, Joo EJ, Ahn YM, Kim YS. Association between CLOCK 3111T/C and preferred circadian phase in Korean patients with bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010 Oct 1;34(7):1196-201.

Le-Niculescu H, Patel SD, Bhat M, Kuczynski R, Faraone SV, Tsuang MT, McMahon FJ, Schork NJ, Nurnberger JI Jr, Niculescu AB 3rd. Convergent functional genomics of genome-wide association data for bipolar disorder: comprehensive identification of candidate genes,

pathways and mechanisms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Mar 5;150B(2):155-81.

Levine J, Barak Y, Chengappa KN, Rapoport A, Rebey M, Barak V. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology*. 1999 Nov;40(4):171-6.

Li H, Hong W, Zhang C, Wu Z, Wang Z, Yuan C, Li Z, Huang J, Lin Z, Fang Y. IL-23 and TGF- $\beta$ 1 levels as potential predictive biomarkers in treatment of bipolar I disorder with acute manic episode. *J Affect Disord*. 2015 Mar 15;174:361-6.

Lopez, A.D.; Murray, C.C.; The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*. 4(11): 1241-1243. 1998.

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

Luo Y, He H, Zhang M, Huang X, Fan N. Altered serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-18 in manic, depressive, mixed state of bipolar disorder patients. *Psychiatry Res*. 2016 Oct 30;244:19-23.

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.

Malhi GS, Tanious M, Das P, Coulston CM, Berk M. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. Current understanding. *CNS Drugs*. 2013;27(2):135–153.

Malkoff-Schwartz S, Frank E, Anderson B, Sherrill JT, Siegel L, Patterson D, Kupfer DJ. Stressful life events and social rhythm disruption in the onset of manic and depressive bipolar episodes: a preliminary investigation. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Aug;55(8):702-7.

Malvache A, Reichinnek S, Villette V, Haimerl C, Cossart R. Awake hippocampal reactivations project onto orthogonal neuronal assemblies. *Science*. 2016 Sep 16;353(6305):1280-3.

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, Lenox RH. The nature of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Supp 13:42-57.

McCarthy MJ, Nievergelt CM, Shekhtman T, Kripke DF, Welsh DK, Kelsoe JR. Functional genetic variation in the Rev-Erba pathway and lithium response in the treatment of bipolar disorder. *Genes Brain Behav*. 2011 Nov;10(8):852-61

McEachron DL, Kripke DF, Hawkins R, Haus E, Pavlinac D, Deftos L. Lithium delays biochemical circadian rhythms in rats. *Neuropsychobiology*. 1982;8(1):12-29.

McGonigle P. Animal models of CNS disorders. *Biochem Pharmacol*. 1;87(1):140-9, 2014.

McMurray F, Patten DA, Harper ME. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Nov;24(11):2301-2310.

McNamara RK, Lotrich FE. Elevated immune-inflammatory signaling in mood disorders: a new therapeutic target? *Expert Rev Neurother*. 2012 Sep;12(9):1143-61.

Meewisse ML, Reitsma JB, de Vries GJ, Gersons BP, Olf M. Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2007; 191:387-92.

Michelon L, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Miguita K, Breen G, Collier D, Vallada H. Association study of the INPP1, 5HTT, BDNF, AP-2beta and GSK-3beta GENE variants and retrospectively scored response to

lithium prophylaxis in bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2006 Aug 7;403(3):288-93. Epub 2006 Jun 19.

Miller AH, Haroon E, Raison CL, Felger JC. Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress Anxiety*. 2013 Apr;30(4):297-306.

Miller TH. Bipolar Disorder. *Prim Care*. 2016 Jun;43(2):269-84.

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

Monfrim X, Gazal M, De Leon PB, Quevedo L, Souza LD, Jansen K, Oses JP, Pinheiro RT, Silva RA, Lara DR, Ghisleni G, Spessato B, Kaster MP. Immune dysfunction in bipolar disorder and suicide risk: is there an association between peripheral corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 $\beta$ ? *Bipolar Disord*. 2014 Nov;16(7):741-7.

Montes JM, Alegria A, Garcia-Lopez A, Ezquiaga E, Balanzá-Martínez V, Sierra P, Toledo F, Alcaraz C, Perez J, de Dios C. Understanding bipolar disorder in late life: clinical and treatment correlates of a sample of elderly outpatients. *J Nerv Ment Dis*. 2013 Aug;201(8):674-9.

Moore K, Roberts LJ 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 1998; 28(6):659-71.

Moreira J, Geoffroy PA. Lithium and bipolar disorder: Impacts from molecular to behavioural circadian rhythms. *Chronobiol Int*. 2016;33(4):351-73.

Munkholm K, Vinberg M, Vedel Kessing L. Cytokines in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2013 Jan 10;144(1-2):16-27.

Munkholm K, Weikop P, Kessing LV, Vinberg M. Elevated levels of IL-6 and IL-18 in manic and hypomanic states in rapid cycling bipolar disorder patients. *Brain Behav Immun*. 2015 Jan;43:205-13.

Na JR, Oh DR, Han S, Kim YJ, Choi E, Bae D, Oh DH, Lee YH, Kim S, Jun W. Antistress Effects of *Rosa rugosa* Thunb. on Total Sleep Deprivation-Induced Anxiety-Like Behavior and Cognitive Dysfunction in Rat: Possible Mechanism of Action of 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist. *J Med Food*. 2016 Sep;19(9):870-81.

Nahman S, Belmaker RH, Azab AN. Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells. *Innate Immun* 2012; 18: 447–458.

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.

Nassar A, Azab AN. Effects of lithium on inflammation. *ACS Chem Neurosci*. 2014 Jun 18;5(6):451-8.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 13(10):1161-9, 2010.

Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 2000;80(1):315-60.

Nogoceke FP, Barcaro IM, de Sousa DP, Andreatini R. Antimanic-like effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in mice. *Neurosci Lett*. 2016 Apr 21;619:43-8.

Oliveira FS, Carvalho NB, Brandão AP, Gomes MT, de Almeida LA, Oliveira SC. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 is essential for initial host control of *Brucella abortus* infection. *Infect Immun*. 2011 Nov;79(11):4688-95.

Opp MR. Corticotropin-releasing hormone involvement in stressor-induced alterations in sleep and in the regulation of waking. *Adv Neuroimmunol*. 1995;5(2):127-43.

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.

Özerdem A, Ceylan D, Can G. Neurobiology of Risk for Bipolar Disorder. *Curr Treat Options Psychiatry.* 2016;3(4):315-329. Epub 2016 Oct 20.

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.

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.

Rasch B, Born J. About sleep's role in memory. *Physiol Rev.* 2013 Apr;93(2):681-766.

Remlinger-Molenda A, Wójciak P, Michalak M, Rybakowski J. Activity of selected cytokines in bipolar patients during manic and depressive episodes. *Psychiatr Pol* 2012; 46: 599–611.

Rise IV, Haro JM, Gjervan B. Clinical features, comorbidity, and cognitive impairment in elderly bipolar patients. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016 May 17;12:1203-13.

Ritter PS, Kretschmer K, Pfennig A, Soltmann B. Disturbed sleep in bipolar disorder is related to an elevation of IL-6 in peripheral monocytes. *Med Hypotheses.* 2013; 81:1031–1033.

Rosenblat JD, Gregory JM, McIntyre RS. Pharmacologic implications of inflammatory comorbidity in bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol*. 2016 Aug;29:63-9.

Roybal K, Theobald D, Graham A, DiNieri JA, Russo SJ, Krishnan V, Chakravarty S, Peevey J, Oehrlein N, Birnbaum S, Vitaterna MH, Orsulak P, Takahashi JS, Nestler EJ, Carlezon WA Jr, McClung CA. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *PNAS*. 2007, 104:6406–6411.

Rubin de Celis MF, Bornstein SR, Androutsellis-Theotokis A, Andoniadou CL, Licinio J, Wong ML, Ehrhart-Bornstein M. The effects of stress on brain and adrenal stem cells. *Mol Psychiatry*. 2016 May;21(5):590-3.

SAPOLSKY, Robert M. POR QUE AS ZEBRAS NÃO TÊM ULCERAS? Brasil: Ed. Francis, 2008. 1 v. 592p.

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.

Saunders KE, Geddes JR. The management of bipolar disorder. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2016 Mar;77(3):175-9.

Severino G, Manchia M, Contu P, Squassina A, Lampus S, Ardaù R, Chillotti C, Del Zompo M. Association study in a Sardinian sample between bipolar disorder and the nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  gene, a critical component of the circadian clock system. *Bipolar Disord*. 2009 Mar;11(2):215-20.

Shen GH, Alloy LB, Abramson LY, Sylvia LG. Social rhythm regularity and the onset of affective episodes in bipolar spectrum individuals. *Bipolar Disord*. 2008 Jun;10(4):520-9.

Sigitova E, Fišar Z, Hroudová J, Cikánková T, Raboch J. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2016 Oct 31. [Epub ahead of print].

Smotherman WP. Glucocorticoid and other hormonal substrates of conditioned taste aversion. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;443:126-44.

Soeiro-de-Souza MG, Andreazza AC, Carvalho AF, Machado-Vieira R, Young LT, Moreno RA. Number of manic episodes is associated with elevated DNA oxidation in bipolar I disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013 Aug;16(7):1505-12.

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.

Spencer RM. Neurophysiological Basis of Sleep's Function on Memory and Cognition. *ISRN Physiol.* 2013 Jan 1;2013:619319.

Spiers JG, Chen HJ, Sernia C, Lavidis NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Front Neurosci.* 2015 Jan 19;8:456.

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.

Streck EL, Scaini G, Jeremias GC, Rezin GT, Gonçalves CL, Ferreira GK, Réus GZ, Resende WR, Valvassori SS, Kapczinski F, Andersen ML, Quevedo J. Effects of Mood Stabilizers on Brain Energy Metabolism in Mice Submitted to an Animal Model of Mania Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. *Neurochem Res.* 2015 Jun;40(6):1144-52.

Stübner S, Schön T, Padberg F, Teipel SJ, Schwarz MJ, Haslinger A, Buch K, Dukoff R, Lasser R, Müller N, Sunderland T, Rapoport SI, Möller HJ, Hampel H. Interleukin-6 and the soluble IL-6 receptor are decreased in cerebrospinal fluid of geriatric patients with major depression: no alteration of soluble gp130. *Neurosci Lett.* 1999 Jan 15;259(3):145-8.

Subramaniam, M.; Abidin, E.; Vaingankar, J.A.; Nan, L., Heng, D.; Mccrone, P., Chong, S.A. Impact of psychiatric disorders and chronic physical conditions on health-related quality of life: Singapore Mental Health Study. *J Affect Disord.*; 147(1-3): 325-330. 2013.

Suhecki D, Lobo LL, Hipólido DC, Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res.* 1998 Dec;7(4):276-81.

Sugawara M, Hashimoto K, Hattori T, Takao T, Suemaru S, Ota Z. Effects of lithium on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinol Jpn.* 1988 Oct;35(5):655-63.

Szabo ST, Machado-Vieira R, Yuan P, Wang Y, Wei Y, Falke C, Cirelli C, Tononi G, Manji HK, Du J. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of mania. *Neuropharmacology.* 2009 Jan;56(1):47-55.

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

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

Valvassori SS, Budni J, Varela RB, Quevedo J. Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013;35 Suppl 2:S121-31.

Valvassori SS, Tonin PT, Varela RB, Carvalho AF, Mariot E, Amboni RT, Bianchini G, Andersen ML, Quevedo J. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disord.* 2015 Aug;17(5):507-17.

van den Ameele S, van Diermen L, Staels W, Coppens V, Dumont G, Sabbe B, Morrens M. The effect of mood-stabilizing drugs on cytokine

levels in bipolar disorder: A systematic review. *J Affect Disord.* 2016 Oct;203:364-73.

Van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SW, Holsboer F. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry.* 2006 Apr 15;59(8):681-8.

van West D, Van Den Eede F, Del-Favero J, Souery D, Norrback KF, Van Duijn C, Sluijs S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Deboutte D, Van Broeckhoven C, Claes S. Glucocorticoid receptor gene-based SNP analysis in patients with recurrent major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2006 Mar;31(3):620-7.

Versace A, Andreazza AC, Young LT, Fournier JC, Almeida JR, Stiffler RS, Lockovich JC, Aslam HA, Pollock MH, Park H, Nimgaonkar VL, Kupfer DJ, Phillips ML. Elevated serum measures of lipid peroxidation and abnormal prefrontal white matter in euthymic bipolar adults: toward peripheral biomarkers of bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 2014 Feb;19(2):200-8.

VISMARI, Luciana; ALVES, Glaucie Jussilane; PALERMO-NETO, João. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Rev. Psiquiatr. Clín., São Paulo, v.35, n.5, p. 2008.*

Volko CD, Regidor PA, Rohr UD. Model approach for stress induced steroidal hormone cascade changes in severe mental diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016 Mar;25(3):157-70.

Vollert C, Zagaar M, Hovatta I, Taneja M, Vu A, Dao A, Levine A, Alkadhi K, Salim S. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav Brain Res.* 2011 Oct 31;224(2):233-40.

Wang HM, Zhang T, Li Q, Huang JK, Chen RF, Sun XJ. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by lithium chloride suppresses 6-hydroxydopamine-induced inflammatory response in primary cultured astrocytes. *Neurochem Int* 2013; 63: 345–353.

- 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.
- Wang L, Million M, Rivier J, Rivier C, Craft N, Stenzel-Poore MP, Taché Y. CRF receptor antagonist astressin-B reverses and prevents alopecia in CRF over-expressing mice. *PLoS One.* 2011; 6(2):e16377.
- Wang TA, Yu YV, Govindaiah G, Ye X, Artinian L, Coleman TP, Sweedler JV, Cox CL, Gillette MU. Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):839-42.
- Wieck A, Grassi-Oliveira R, do Prado CH, Rizzo LB, de Oliveira AS, Kommers-Molina J, Viola TW, Marciano Vieira EL, Teixeira AL, Bauer ME. Pro-inflammatory cytokines and soluble receptors in response to acute psychosocial stress: differential reactivity in bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2014 Sep 19;580:17-21.
- Wood GE, Young LT, Reagan LP, Chen B, McEwen BS. Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 16;101(11):3973-8.
- Young AH. More good news about the magic ion: lithium may prevent dementia. *Br J Psychiatry.* May;198(5):336-7, 2011.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994;74(1):139-62.
- Zhang L, Zhang HQ, Liang XY, Zhang HF, Zhang T, Liu FE. Melatonin ameliorates cognitive impairment induced by sleep deprivation in rats: role of oxidative stress, BDNF and CaMKII. *Behav Brain Res.* 2013 Nov 1;256:72-81.



**ANEXO A – Parecer da Comissão de ética no Uso de Animais**



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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação Dos Efeitos Do Butirato De Sódio Sobre Os Níveis De Citocinas Em Modelos Animais De Mania Induzidos Por Anfetamina E Privação Do Sono Paradoxal", Protocolo nº 007/2016-1 sob a responsabilidade de Samira da Silva Valvassori, equipe: Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Gustavo C. Dal-Pont, Edemilson Mariot, Camila Leite Ferreira, Jéssica Lopes-Borges, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda, Paula Tonin, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

<b>Vigência do Projeto</b>	01/03/2016 a 01/03/2018
<b>Espécie/Linhagem</b>	Camundongo heterogêneo Black C57Bl/6 Rato heterogêneo Wistar
<b>Nº. De animais</b>	160
<b>Peso/Idade</b>	20-30g / 60 dias 250-300g / 60 dias
<b>Sexo</b>	M
<b>Origem</b>	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

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

**Protocol number: 007/2016-1**

**Principal Investigator:** Samira da Silva Valvassori

**Researchers:** Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Gustavo C. Dal-Pont, Edemilson Mariot, Camila Leite Ferreira, Jéssica Lopes-Borges, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda, Paula Tonin.

**Project title:** "Assessment Of The Effects Of Sodium Butyrate On Levels Of Cytokines In Animal Models Of Mania Induced By Amphetamine And Sleep Deprivation Paradoxical".

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

Criciúma, 23 de fevereiro de 2016.

  
**JAIRO JOSÉ ZOCHE**  
 Coordenador da CEUA