

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNASAU
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GUSTAVO COLOMBO DAL PONT

**LÍTIO E VALPROATO AGEM SOBRE A VIA DE
SINALIZAÇÃO DE PI3K/AKT/GSK-3 β REVERTENDO O
COMPORTAMENTO DO TIPO MANÍACO DE RATOS
SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE MANIA
INDUZIDO PELA OUABAÍNA**

**CRICIÚMA
2016**

GUSTAVO COLOMBO DAL PONT

**LÍTIO E VALPROATO AGEM SOBRE A VIA DE
SINALIZAÇÃO DE PI3K/AKT/GSK-3 β REVERTENDO O
COMPORTAMENTO DO TIPO MANÍACO DE RATOS
SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE MANIA
INDUZIDO PELA OUABAÍNA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Samira da
Silva Valvassori

**CRICIÚMA
2016**

A dissertação 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 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família. Meus pais, Neilôr e Lourdes, que sempre insistiram nos meus estudos e nunca desistiram de mim, me aconselham e me apoiam em minhas decisões, além de estarem sempre comigo em todos os momentos da minha vida, e também meu irmão Neilor, que sempre fez parte da minha vida. A vocês, minha gratidão por tudo.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho do Neurolab e Neurotox, em especial Wilson, Daniela e Roger, pela parceria de todos esses anos, por tudo que me ensinaram e me ajudaram durante a jornada no laboratório. Agradeço também aos alunos de iniciação científica, pela parceria. Vocês são pessoas incríveis, divertidas e humildes, continuem sempre assim.

A minha orientadora, Prof. Dra. Samira da Silva Valvassori, por ter aceitado me orientar, por confiar em mim e acreditar no meu potencial. Agradeço por tudo, ela quem me acolheu desde que entrei no laboratório, por toda orientação, conselhos, foi meu norte em toda jornada do laboratório, ser a maior incentivadora da minha vida acadêmica e, acima de tudo, uma grande amiga.

Por fim, aos professores do mestrado, ao PPGCS, a UNESC, a FAPESC e a todos que direta ou indiretamente ajudaram na minha formação e contribuíram para o meu crescimento, meu muito obrigado!

RESUMO

No transtorno bipolar (TB) ocorre a alternância entre episódios de depressão, mania ou hipomania. O Lítio (Li) é o fármaco mais utilizado como tratamento para o TB. Diversos anticonvulsivantes, como o valproato (VPA), possuem aplicação no tratamento do TB. Estudos mostram que disfunções da Na^+K^+ ATPase estão envolvidas na fisiopatologia do TB. A administração intracerebroventricular (ICV) ouabaína (OUA) (inibidor da Na^+K^+ ATPase) em ratos tem sido considerado um bom modelo animal de mania. A glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) é uma serina/treonina-quinase, geralmente ativa nas células, sendo desativada por sinais originados de vias de sinalização distintas, como a da PI3K/Akt e a da MAPK. Estudos tem demonstrado que Li e VPA inibem diretamente a ação da GSK-3. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do Li ou do VPA sobre a via de sinalização de PI3K/Akt/GSK-3 em um modelo animal de mania induzido pela OUA. Foram utilizados ratos Wistar machos adultos. Os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica, em que foi introduzida uma cânula no ventrículo lateral. No primeiro protocolo, os animais receberam injeções ICV de OUA ou de líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF). Em seguida foram tratados com Li, VPA ou salina durante sete dias. A avaliação da atividade locomotora foi realizada através do teste do campo aberto, sete dias após a administração de OUA. Foram avaliados os níveis de proteínas de vias da GSK-3 [MAPK, PI3K, AKT e GSK-3 β totais e fosforiladas (p)], através das técnicas de *Western Blotting*. No segundo protocolo, os animais receberam injeções ICV de OUA, de aCSF, de AR-A014418 (inibidor de GSK-3) ou OUA+AR-A014418. Sete dias após, esses animais foram submetidos ao teste do campo aberto. O Li e o VPA revertem a hiperatividade induzida pela OUA. Adicionalmente, OUA diminuiu a fosforilação de PI3K, de Akt e de GSK-3 β . O Li e o VPA revertem essas disfunções da via de sinalização da GSK-3 β induzidas pela OUA. Além disso, AR-A014418 reverteu o comportamento do tipo maníaco induzido por OUA. Esses resultados sugerem que os efeitos do tipo maníaco induzidos pela OUA estão associados com a ativação da GSK-3 β (e inibição da PI3K e Akt), e Li e VPA exercem efeitos antimaníacos através da modulação desta via de sinalização. Portanto, sugerem-se mais estudos sobre essa via de sinalização e seu envolvimento no TB.

Palavras-chave: Transtorno Bipolar; Ouabaína; Lítio; Valproato; AR-A014418; GSK-3 β .

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a chronic and recurrent mental disorder, characterized by mood alteration, alternating between manic and depressive episodes. Li is a gold standard to treat for BD. Valproic acid (VPA), which is an anticonvulsant, is also widely used for treat BD. Studies have shown that dysfunctions in $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ were involved in BD. Ouabain (OUA) is a DLCs that inhibits the $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity, and ICV administration inducing hyperactivity in rats. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) is constantly active within the cell, and its activity is inhibited after being phosphorylated by other enzymes, such as PI3K and Akt. GSK-3 has a key role in regulating relevant biological processes in BD. Studies have demonstrated that Li and VPA have a relevant role on GSK-3 sinaling pathway. The present study aimed to investigate the effects of mood stabilizers, specifically lithium (Li) and valproate (VPA), on PI3K/Akt signaling pathway in the brains of rats subjected to the ouabain (OUA)-induced animal model of mania. In addition, it was evaluated the effects of AR-A014418, a GSK-3 β inhibitor, on manic-like behaviour induced by OUA. In the first experimental protocol Wistar rats received a single ICV injection of OUA or artificial cerebrospinal fluid (aCSF). From the day following ICV injection, the rats were treated for 6 days with intraperitoneal injections of saline, Li or VPA twice a day. In the second experimental protocol, rats received OUA, aCSF, OUA plus AR-A014418, or aCSF plus AR-A014418. In the 7th day after OUA injection, locomotor activity was measured using the open-field test. In addition, we analyzed levels of p-PI3K, p-MAPK, p-Akt, p-GSK-3 β in the brain of rats by immunoblot. Li and VPA reversed OUA-related hyperactivity. OUA decreased pPI3K, pAkt and pGSK-3 β levels. Li and VPA improved these OUA-induced cellular dysfunctions; however, the effects of the mood stabilizers were dependent on the protein and brain region analyzed. In addition, AR-A014418 reversed the manic-like behavior induced by OUA. These findings suggest that the manic-like effects of ouabain are associated with the activation of GSK-3 β , and that Li and VPA exert protective effects against OUA-induced inhibition on GSK-3 β pathway.

Keywords: Bipolar Disorder, Ouabain, Lithium, Valproate, AR-A014418, GSK-3 β .

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

aCSF: Lquido Cefalorraquidiano Artificial
Akt: Proteína kinase B (ou PKB)
CBZ: Carbamazepina
DA: Dopamina
DA: Dopamina
DAT: Dopamine active transporter
Drp1: Dynamain-related protein 1
DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatstico de Transtornos Mentais 5
GSK-3: Glicogênio Sintase kinase 3
I.P.:Intraperitoneal
ICV: Intracerebroventricular
Li: Lítio
MAPK: Proteína kinase ativada por mitógenos
mTORC2: Targeting of rampamicin complex 2
Na⁺K⁺ATPase: sódio-potássio de adenosina trifosfatase
OMS: Organização Mundial de Saúde
OUA: Ouabaína
PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinase
SOD: Superóxido Dismutase
TB: Transtorno Bipolar
VPA: Valproato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR.....	21
1.1.1 Tratamento do Transtorno Bipolar	22
1.2 VIA PI3K/Akt/GSK-3.....	22
1.2.1 Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK-3)	23
1.3 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS	26
1.3.1 Modelo animal de mania induzido por ouabaína	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	31
3.2 ANIMAIS	31
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL I	31
3.3.1 Procedimento Cirúrgico	31
3.3.2 Administração Intracerebroventricular e tratamento	32
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL II.....	33
3.4.1 Administração Intracerebroventricular e tratamento	33
3.5 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	34
3.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E WESTERN BLOTTING	35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4 RESULTADOS	37
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	67
ANEXO A.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno crônico e recorrente, em que ocorre a alternância entre episódios de depressão, mania ou hipomania, sendo que estes podem ocorrer de forma isolada ou mista (American Psychiatric Association, 2013). De acordo com o DSM-5, o marco clínico para o diagnóstico do TB é a mania. Porém, a alternância entre os estados de humor neste transtorno pode ser de dois tipos: com a presença de mania e depressão (tipo I) ou hipomania e depressão (tipo II). No Brasil, de acordo com Viana e Andrade (2012), o TB apresentou uma prevalência geral de 2,1%, sendo que do tipo I apresenta prevalência de 0,9%, enquanto que o TB do tipo II apresentou prevalência de 0,2%.

O marco clínico do diagnóstico de TB é a presença de episódios maníacos. O paciente bipolar em um episódio maníaco apresenta pensamento acelerado, aumento de energia, humor elevado e ideias de grandeza que podem ser até delirantes, tornando-se eufórico e facilmente irritável. Já na depressão bipolar, o paciente apresenta humor deprimido, baixa-autoestima e, em muitos casos, pensamentos suicidas. Entre os períodos de mania e depressão podem ocorrer episódios mistos, em que o paciente apresenta características dos dois polos, ou seja, alternando subitamente o humor entre mania e depressão (Kapczinski e Quevedo, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o TB é a sexta maior causa de incapacidade e a terceira entre as doenças mentais, ficando atrás apenas da depressão unipolar e da esquizofrenia (Costa, 2008). Na prática clínica, os pacientes com TB possuem, com bastante frequência, comorbidades. Os índices de comorbidades entre os pacientes diferem significativamente entre tipo I, com 88,2% e tipo II, com 83,1% (Merikangas et al., 2011). Entre as causas de comorbidade em pacientes com TB, destacam-se o abuso de substâncias e o transtorno de ansiedade (Bega et al., 2012; Mitchell et al., 2013). O TB é caracterizado como um problema de saúde pública, estando associado a elevados riscos de mortalidade. Aproximadamente 25% dos pacientes tentam suicídio em alguma etapa de suas vidas, sendo que 11% completam este intento (Merikangas et al, 2011; Mitchell et al., 2013).

1.1.1 Tratamento do Transtorno Bipolar

O tratamento de pacientes com TB ainda constitui uma tarefa altamente complexa, antes de tudo, por envolver estratégias distintas nos diferentes estágios desse transtorno (Cheniaux, 2011). O lítio (Li) é o “padrão ouro” utilizado no tratamento do TB, sendo o primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration*, e já vem sendo utilizado há mais de 50 anos para o tratamento nas fases agudas e de manutenção do TB. É eficaz nos episódios de mania aguda, sendo particularmente indicado para mania eufórica e hipomania. Também oferece propriedades anti-suicidas; porém, seu uso requer cuidados, no sentido de que a retirada abrupta predispõe a um risco aumentado de recaídas e suicídio (Kapczinski e Quevedo, 2016).

Diversos anticonvulsivantes possuem aplicação no tratamento do TB, os quais vêm sendo amplamente utilizados na prática clínica, sendo que, atualmente, o valproato (VPA) e a carbamazepina (CBZ) fazem parte desse arsenal terapêutico, ambos com propriedade antimaníacas. Assim como o Li, estes anticonvulsivantes também apresentam inconvenientes, como falta de eficácia para a totalidade dos pacientes, interações farmacológicas, teratogenicidade e a necessidade de monitoração terapêutica (Kapczinski e Quevedo, 2016; Miller, 2016).

Diante dessas opções terapêuticas, o que deveria ser observado na prática clínica seria um cenário bastante otimista. Contudo, o que se observa é que a maioria dos pacientes bipolares, mesmo seguindo um tratamento regular e adequado, apresenta uma evolução desfavorável. Isso se dá pelo fato de que existem muitos sintomas que resistem ao tratamento. Além disso, alguns pacientes acabam por não aderir ao tratamento devido aos efeitos colaterais dos fármacos. Dentre os efeitos colaterais mais comuns podemos citar: aumento de peso, poliúria, tremor, fadiga, problemas dermatológicos, lentidão dos movimentos e problemas sexuais (Rosa et al., 2006; Cheniaux, 2011). Lembrando que o Li, apesar de todos os seus efeitos colaterais, ainda é a medicação mais indicada para o tratamento do TB, pois é o medicamento que age de forma mais eficaz frente aos sintomas do transtorno e também agir sobre diversas vias de sinalização.

1.2 VIA PI3K/Akt/GSK-3

Fosfatidil Inositol 3 Quinase, ou PI3K, é uma importante proteína quinase envolvida nos processos de diferenciação celular e de regulação da mitogênese. Essa proteína é considerada essencial para que ocorra o transporte de glicose, por agir sobre a fosforilação de outras proteínas

envolvidas nesse transporte (Shepherd et al, 1995; Czech e Corvera, 1999). Inicialmente, a PI3K foi identificada como um dímero, tendo uma subunidade regulatória (p85) e uma subunidade catalítica (p110) (Backer et al., 1992). A ativação da PI3K se dá através da sinalização celular em diversos tipos de receptores, que em sucessão é modulada por fatores genéticos ou ambientais (Liu e Yao, 2016). A PI3K catalisa a fosforilação da proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt (White e Kahn, 1994; Bayascas, 2008).

A Akt é uma enzima do tipo serina/treonina quinase que, quando acoplada a membrana celular, sofre uma alteração na sua conformação, que leva a ativação dos aminoácidos treonina 308 e serina 407, que finalmente levam a ativação dessa enzima (Vivanco e Sawyers, 2002). A família Akt, identificada em mamíferos, possui as isoformas Akt1, Akt2 e Akt3, as quais podem ser ativadas pelo mesmo mecanismo descrito anteriormente (Okano et al., 2000). Essa enzima possui papel fundamental na progressão do ciclo e crescimento celular, diferenciação de células musculares, como também em outros processos tais como estimulação da absorção de glicose, inibição de apoptose (Takuwa et al., 1999; Hayashi et al., 1999; Summers et al., 1999; Zhou et al., 2000).

A via de sinalização PI3K/Akt (**Figura 1**) possui um importante papel na regulação do crescimento celular, proliferação, migração, entre outras funções (Cantley, 2002). Após ser ativada, via fosforilação através da PI3K, a Akt fosforila e inativa a enzima glicogeno sintase quinase 3 (GSK-3), levando a ativação da glicogênio sintase (GS), que como consequência, leva a síntese de glicogênio (Cohen et al, 1997).

1.2.1 Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK-3)

A GSK-3 é uma serina/treonina quinase, que ao contrário da maioria das quinases, está constantemente ativada na célula, e interage com diversas vias de sinalização, como a via Wnt, MAPK, PI3K e Akt (Doble e Woodgett, 2003). A MAPK é um importante regulador de excitabilidade sináptica, expressão gênica, entre outras funções (Pernice et al., 2016). Em mamíferos, existem duas isoformas de GSK-3: GSK-3 α e GSK-3 β , as quais regulam processos de apoptose e de plasticidade celular (Crowder e Freemam, 2000; Zhao et al., 2007). Evidências sugerem que a atividade aumentada de GSK-3 estimula processos apoptóticos e, inibindo sua atividade, atenua ou previne apoptose (Gould et al., 2006). A GSK-3 β altera sua conformação quando fosforilada em Serina 9, a qual consiste na ligação da região N-terminal ao domínio catalítico, impedindo a ligação de um substrato, tornando-se inativada (**Figura 2**) (Beurel et al., 2015).

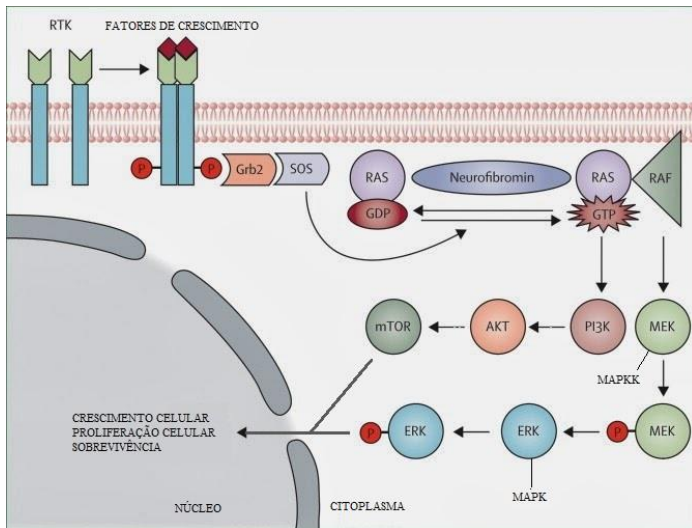


Figura 1: Via de sinalização PI3K/Akt. A ligação de fatores de crescimento com enzimas receptoras (RTK) resulta em auto-fosforilação e também na formação de dímeros. A proteína adaptadora Grb2 se liga ao receptor, assim formando um complexo com a SOS. Como resultado dessa ligação, ocorre a estimulação da troca de GDP para GTP na RAS. A Neurofibromina tem atividade RAS-GTPase e inativa a RAS. Por sua vez, a RAS ativa a PI3K, a AKT e a mTOR. Essa via também é capaz de modular a atividade de GSK-3. Paralelamente, também ocorre a ativação da via das MAPK's, em que a RAS fosforila e ativa a MEK e a ERK. RTKs = tirosina quinase receptora. P = fosforilação. Grb2 = proteína associada a receptor de fator de crescimento 2. SOS = homólogo mamífero do Son of Sevenless da *Drosophila*; RAS = homólogo do oncogene viral do sarcoma do rato. GDP = guanosina difosfato. GTP = guanosina trifosfato. RAF = homólogo do oncogene viral do sarcoma murino. MEK = MAPK-ERK quinase. PI3K = fosfatidilinositol-3-quinase. AKT = Proteína quinase B. mTOR = alvo da rapamicina em mamíferos. NA: No contexto dos condrócitos, pense em fatores de crescimento como os FGF e a RTK como o FGFR3 Adaptado de Brems et al., 2009.

O inicial interesse na GSK-3 β como um alvo terapêutico para transtornos de humor foi através da observação de que lítio podia inibir diretamente essa enzima (Klein e Melton, 1996). Estudos demonstram que a diminuição de plasticidade e a atrofia celular estão envolvidas no TB e que lítio exerce efeitos neuroprotetores (Coyle e Duman, 2003). Alguns experimentos comportamentais em modelos animais (modelos genéticos e farmacológicos) tem mostrado que a manipulação da cascata de sinalização da GSK-3 β produz ambos os efeitos, antidepressivo e

antimaníaco em modelos de depressão ou de mania. Em camundongos transgênicos que superexpressavam GSK-3 β foi observado um comportamento de hiperatividade, o qual é considerado um comportamento do tipo maníaco (Prickaerts et al., 2006). O inibidor da GSK-3 β , AR-A014418, administrado de forma i.c.v. reduziu a imobilidade no teste de nado forçado e atenuou a hiperatividade induzida por anfetamina em ratos (Gould et al., 2004).

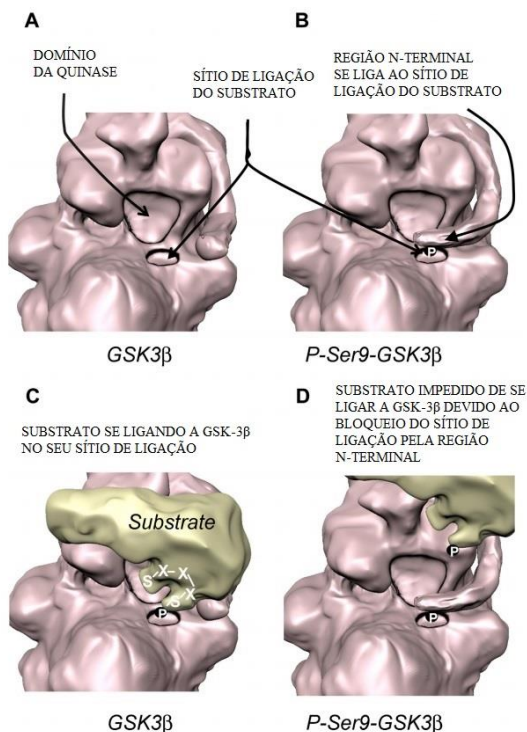


Figura 2: Fosforilação de GSK-3 β em Serina 9. A: Conformação natural de GSK-3 β quando ativa dentro da célula, com destaque para as regiões regulatória e catalítica. B: Conformação de GSK-3 β após fosforilação em serina 9, com a mudança da cauda N-terminal. C: Ligação de um substrato na região catalítica de GSK-3 β ocorrendo de forma natural. D: Com a mudança de conformação da GSK-3 β após fosforilada em serina 9, o substrato fica impedido de se ligar a região catalítica. Figura retirada de Beurel et al., 2015.

Além disso, estudos tem demonstrado que a GSK-3 β está envolvida com uma série de doenças mentais, tais como Doença de Alzheimer, TB

e esquizofrenia (Doble e Woodgett, 2003; Su et al., 2014). Os estabilizadores do humor, Li e VPA, são inibidores seletivos da GSK-3 β (De Sarno et al., 2002; Machado-Vieira et al., 2009; Jope, 2011; Cechinel-Recco et al., 2012; Huang et al., 2014). Portanto, essa molécula parece ter um papel fundamental na fisiopatologia do TB.

1.3 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Recentes avanços genéticos, neurobiológicos e farmacológicos tem contribuído para o desenvolvimento de novos modelos animais, os quais tem sido uma ferramenta importante para o estudo de sistemas intracelulares que podem estar envolvidos na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (Manji e Chen, 2002; Einat et al., 2003). Entretanto, nenhum modelo animal, até o momento, mimetiza totalmente um determinado transtorno psiquiátrico. Principalmente o TB, que apresenta um curso clínico complexo, com alterações de humor recorrentes, incluindo episódios maníacos, depressivos e mistos, tornando o desenvolvimento de um modelo animal adequado um desafio para a comunidade científica (Machado-Vieira et al., 2004).

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

1.3.1 Modelo animal de mania induzido por ouabaína

Estudos tem caracterizado o modelo animal de mania induzido pela administração intracerebroventricular (ICV) de ouabaína (OUA) – um potente inibidor da sódio-potássio de adenosina trifosfatase ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$) (Xue et al., 1997; El-Mallakh et al., 2003; Hennion et al., 2002; Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011). Os estudos prévios deste grupo de pesquisa demonstraram que a reprodução dos sintomas tipo-maníaco (hiperatividade após a injeção ICV de OUA em ratos) permanece por sete dias após uma única administração (Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011), o que contempla a validade de face do modelo. Neste contexto, contemplando a validade de construção do modelo, diversos estudos tem mostrado que pacientes bipolares apresentam uma diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, tanto em episódios maníacos quanto em episódios depressivos (Coppen et al.,

1966; Looney e El-Mallakh, 1997; Li e El-Mallakh, 2004). Além disso, foi encontrado um aumento de OUA endógena, um glicosídeo produzido pela adrenal e pelo hipotálamo, no córtex parietal de pacientes bipolares quando comparado com controles saudáveis (Goldstein et al., 2006).

A administração de OUA em ratos, além de induzir hiperatividade, parece induzir também hipoatividade, que pode ser considerada sintoma do tipo-depressivo. Ambos os sintomas induzidos pela OUA são prevenidos pela administração de Li, que como descrito anteriormente, é um clássico estabilizador do humor usado no tratamento de TB (Xue et al., 1997; Jornada et al., 2011), contemplando a validade preditiva do modelo. Juntos esses estudos demonstram que a administração ICV de OUA em ratos pode ser considerada um bom modelo animal de mania, pois contempla, como já citado anteriormente, as três validades para a caracterização de um modelo animal de mania: a validade de face, de construção e preditiva.

Há uma grande variedade de estratégias para medicamentos em desenvolvimento, que ainda necessitam de estudos mais elaborados e, principalmente, em longo prazo. Entre as pesquisas farmacoterápicas em curso, merecem atenção especial aquelas acerca dos novos estabilizadores do humor, cujo potencial terapêutico parece contribuir tanto para a remissão dos sintomas quanto para a proteção neuronal (Ribeiro et al., 2005). Diante desta realidade, observa-se uma dificuldade no tratamento do TB, visto que a maioria deles visa apenas tratar os sintomas do transtorno. Por isso à importância de pesquisas na busca de, não apenas novos fármacos, mas também na busca de novos alvos terapêuticos para o TB. Apesar da importância do TB para a carga global de doenças, seu tratamento não teve considerável evolução desde sua descoberta, principalmente pelo pouco conhecimento sobre a sua fisiopatologia. Tendo em vista o atual panorama do transtorno, o presente estudo se faz importante por investigar a via da PI3K/Akt/GSK-3 β como possível novo parâmetro fisiopatológico no TB.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de Li e de VPA sobre as vias da MAPK/GSK-3 β e da PI3K/Akt/GSK-3 β em um modelo animal de mania induzido por OUA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos de Li e de VPA sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos de Li e de VPA sobre os níveis totais e fosforilados de PI3K em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos de Li e de VPA sobre os níveis totais e fosforilados de Akt em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos de Li e de VPA sobre os níveis totais e fosforilados de GSK-3 β em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos de Li e de VPA sobre os níveis totais e fosforilados de MAPK em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA;
- Avaliar os efeitos do AR-A014418 sobre a atividade locomotora de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto foi executado sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, através do protocolo nº 001/2016-1 (Anexo A).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 84 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, machos, adultos (60 dias), com 250-300g, provenientes do biotério da UNESC. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (41x34x16 cm), cinco ratos por caixa, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00h às 18:00h), recebendo comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL I

3.3.1 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 80 mg/kg e xilasina 10 mg/kg intramuscular. No aparelho estereotáxico, foi removida a pele na região craniana do rato. A cânula guia - de 1 mm - foi implantada no ventrículo lateral a partir das seguintes coordenadas: 0,9 mm para trás do bregma, 1,5 mm à direita do bregma e 2,6 mm de profundidade (**Figura 3**). Em seguida, a fixação da cânula guia foi feita com acrílico dental. Os animais ficaram em recuperação durante três dias (**Figura 4**), antes da administração ICV. Os procedimentos pós-operatórios, feitos para minimizar o sofrimento dos animais, se deram da seguinte forma: 1) foi colocado aquecedor para evitar hipotermia, que pode ser induzida pelo anestésico utilizado no presente estudo; 2) os animais foram observados até acordarem para que eles não se machucassem após a operação; 3) os animais receberam uma única injeção intramuscular do analgésico Tramadol (10mg/kg), o qual possui efeitos que perduram por sete dias.

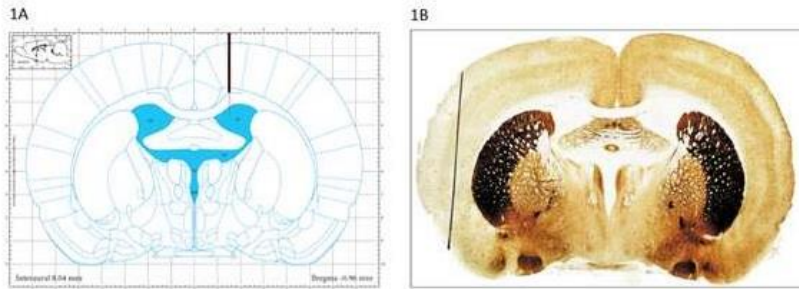


Figura 3: Corte histológico de localização da cânula. A: Representação esquemática da região injetada. A linha vertical preta representa a cânula guia implantada durante a cirurgia estereotáxica, e a linha vermelha representa a infusão da agulha no ventrículo lateral. B: Corte cerebral das áreas do ventrículo. Figura adaptada de Paxinos e Watson (2006).

3.3.2 Administração Intracerebroventricular e tratamento

As injeções ICV de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF- sigla do inglês) foram administradas 72 h após a cirurgia. Imediatamente após a administração ICV, os ratos, que receberam 5µl de OUA 10^{-3} M ou aCSF, começaram ser tratados com injeções intraperitoneais (i.p.) de salina (NaCl 0,9%; 2vezes/dia), Li (47,5mg/kg; 2vezes/dia) ou VPA (200mg/kg; 2vezes/dia). A administração dos fármacos permaneceu durante sete dias. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: aCSF ICV + salina ip (aCSF + Sal); aCSF ICV + lítio ip (aCSF + Li); aCSF ICV + valproato ip (aCSF + VPA); OUA ICV + salina ip (OUA + Sal); OUA ICV + lítio ip (OUA + Li); OUA ICV + valproato ip (OUA + VPA).

Para o cálculo da amostra do modelo animal por infusão (ICV) de OUA, foi levado em consideração a mortalidade e a perda da cânula nos animais. Nos últimos seis anos, este grupo de pesquisa tem trabalhado com cirurgia para a implantação de cânula guia no ventrículo lateral de ratos (Riegel et al., 2009; 2010; Jornada et al., 2010; 2011; Arent et al., 2011), e foi possível observar que há uma perda de aproximadamente 30% dos animais. Ao final do experimento, foram utilizados 14 animais por grupo, totalizando 84 animais. Vinte e quatro horas após o ICV, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, e imediatamente após o teste, foram submetidos a eutanásia por decapitação, onde foi retirado o cérebro dos animais. Foram retirados o córtex-frontal e o hipocampo dos animais para posteriores análises bioquímicas.

As doses das substâncias utilizadas no presente estudo foram baseadas em estudos anteriores: OUA foi retirada de Riegel et al. (2009), Li e

VPA de Jornada et al. (2010). Todos os animais tratados com Li tiveram os níveis plasmáticos de Li entre 0,6 e 1,2 mEq/L, conforme recomendado no tratamento para TB.

Verificações *postmortem* do local da cânula foram executadas conforme estudos anteriores (Barros et al., 1999). Foi verificado histologicamente no cérebro de 33% dos animais de cada grupo. Em todos os animais analisados, a cânula estava corretamente posicionada.

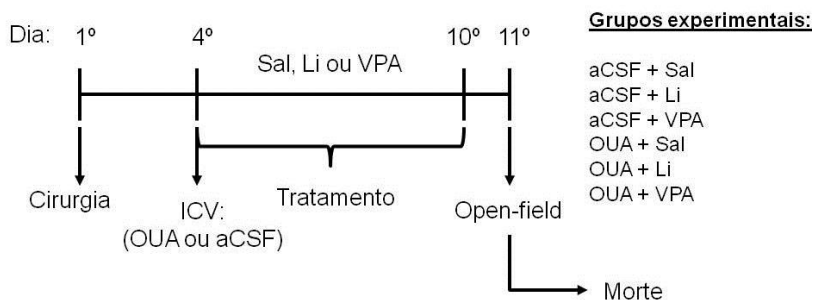


Figura 4: Desenho experimental I. No primeiro dia foi realizada a cirurgia estereotáxica para a implantação da cânula no ventrículo lateral. Após 72h (no quarto dia), os animais receberam uma administração ICV de OUA ou aCSF, e imediatamente após o ICV, os animais receberam o tratamento via intraperitoneal com Sal, Li ou VPA, que continuou durante sete dias. Vinte e quatro horas após a última administração via i.p. (no 11º dia de experimento), os animais foram submetidos ao teste do Campo Aberto (Open Field), e logo após o teste comportamental, foram submetidos à morte por decapitação.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL II

Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e cuidados pós-operatórios do Desenho Experimental I. Foram utilizados 7 animais por grupo, totalizando 28 animais.

3.4.1 Administração Intracerebroventricular e tratamento

Os animais receberam uma única injeção ICV de 4µl de OUA 10^{-3} M dissolvida em aCSF, ou 4µl apenas de aCSF. Juntamente com a administração dessas duas substâncias, os animais receberam 1µl de AR-A014418 (1,2mM) ou 1µl de aCSF. As injeções

intracerebroventricular de OUA, aCSF ou AR-A014418 foram administradas 72 h após a cirurgia (**Figura 5**). Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: aCSF + aCSF; aCSF + AR-A014418; OUA + aCSF; OUA + AR-A014418. Sete dias após o ICV, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

A dose de AR-A014418 utilizada no presente estudo (1,2mM) foi baseada no estudo anterior de Gould et al. (2004). Os autores demonstraram que a administração de AR-A014418 na dose de 30mmol/kg resulta em uma concentração cerebral de aproximadamente 1,2mM, que reverteu a hiperatividade induzida por anfetamina em ratos (Gould et al., 2004).

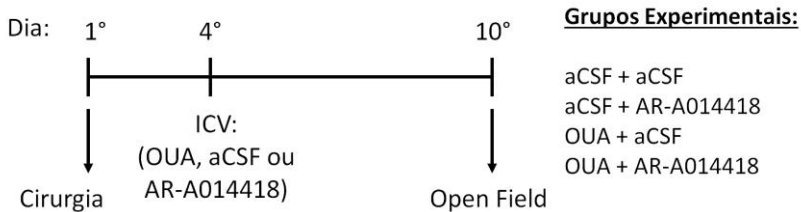


Figura 5: Desenho experimental II. No primeiro dia, foi realizada a cirurgia estereotáxica para a implantação da cânula no ventrículo lateral. Após 72h (no quarto dia), os animais receberam uma administração ICV de OUA (OUA), AR-A014418 ou aCSF, e imediatamente após o ICV. Sete dias após o ICV (10° dia de experimento), os animais foram submetidos ao teste do Campo Aberto, e logo após o teste comportamental, foram submetidos à morte por decapitação.

3.5 TESTE DO CAMPO ABERTO

Vinte e quatro (24) horas após a última aplicação do tratamento (Li ou VPA), os animais foram submetidos ao teste do campo aberto a fim de avaliar a atividade locomotora. O aparelho para a realização deste teste comportamental consiste em uma caixa com 40x60 cm de comprimento e 50 cm de altura, com as paredes laterais e do fundo em madeira, a parede da frente de vidro transparente, e o chão em madeira (dividido por linhas pretas formando nove quadrantes), com uma lâmina de vidro por cima, sem cobertura no teto. Os animais foram colocados na sala de realização do teste 30 minutos antes do início, para habituação com o local.

O teste consiste em colocar o animal dentro da caixa, no canto superior direito, permanecendo no aparelho durante 5 minutos. Neste teste foi avaliado: 1) o número de vezes em que o animal cruzou cada quadrante (*crossing*, parâmetro avaliado para mensurar atividade

locomotora); 2) o número de vezes que o animal suspendeu o corpo através das patas traseiras (*rearings*, parâmetro avaliado para mensurar atividade exploratória); 3) número de vezes que o animal foi até o quadrante centra do aparelho (visitas ao centro, parâmetro avaliado para mensurar comportamento de risco); 4) o número de vezes que o animal apresentou comportamento de limpeza do corpo (*grooming*, parâmetro avaliado para mensurar comportamento estereotípico) e; 5) o número de vezes que o animal apresentou comportamento de esfregar as vibrissas com as patas dianteiras (*sniffing*, parâmetro avaliado para mensurar comportamento estereotípico). O aparelho foi limpo entre um animal e outro com álcool 10%.

3.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E WESTERN BLOTTING

Após o teste do campo aberto do desenho experimental I, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação com uso de guilhotina. Os cérebros dos animais foram dissecados para a retirada do córtex-frontal e hipocampo. Imediatamente após, as amostras de córtex frontal e hipocampo foram solubilizadas em tampão de amostra composto por dodecilsulfato de sódio (SDS) 4%, Tris 50 mM, EDTA 100mM e b-mercaptoetanol 8%, pH 6,8. A expressão das proteínas foi detectada por *Western blot* como descrito por Leal et al. (2002). As amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS (SDS-PAGE) em um sistema "mini-gel" (BioRad, EUA). As proteínas foram transferidas para as membranas de transferência de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) Immobilon-FL (Millipore, EUA). A carga da proteína e a eficiência de transferência de mancha foram monitoradas por coloração com Ponceau S (0,5% de Ponceau: 1% de ácido acético). As membranas foram bloqueadas durante 1 h com solução salina tamponada com Tris (TBS) e 0,1% de Tween-20 (TBST-T) (pH 7,4) e leite (0.5%). As proteínas foram detectadas utilizando os anticorpos primários: anti-total GSK-3 β (GSK-3 β), anti-fosfo-GSK-3 β (Ser 9) (p-GSK-3 β), anti-total AKT (AKT), anti-fosfo-AKT (p-AKT), anti-total PI3K (PI3K), anti-fosfo-PI3K (p-PI3K), diluídos em TBS-T e armazenado durante a noite a 4°C. Após a lavagem, as membranas foram incubadas durante 1 h com anticorpo de cabra anti-camundongo (1: 5000; Sigma Aldrich, EUA) conjugado a uma peroxidase. Os imunocomplexos foram visualizados pelo sistema de detecção de quimioluminescência reforço (GE Healthcare, Reino Unido) como descrito pelo fabricante. A análise densitométrica foi efetuada utilizando o software ImageJ (versão Java 1.6.0_20, EUA). As concentrações de

proteína total foram determinadas utilizando o método descrito por Lowry e colaboradores (1951).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes comportamentais e imunoquímicos a diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, utilizando o software Statistica 7®, e para a construção dos gráficos foi utilizado o programa Graph Prism 5®. Quando o valor de F foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Duncan. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. As correlações foram analisadas utilizando a correlação de Pearson. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para analisar força da relação entre variáveis contínuas.

4 RESULTADOS

Avaliação dos efeitos de Li e de VPA sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA

A **Figura 6** mostra os efeitos do tratamento com Li e VPA sobre o comportamento do tipo maníaco, induzido pela administração ICV de OUA nos ratos. Análises posteriores utilizando post hoc de Duncan mostraram que a administração de OUA aumentou a locomoção (*crossings*) (**Figura 6A**), exploração (*rearings*) (**Figura 6B**), comportamento de risco (visitas ao centro do open field) (**Figura 6C**) e comportamentos do tipo estereotípico (*Grooming* **Figura 6D** e *Sniffing* **Figura 6E**). As alterações comportamentais induzidas por OUA foram prevenidas pelo Li e pelo VPA. Li e VPA reduziram a hiperatividade sem afetar a locomoção e exploração natural dos animais, indicando que os efeitos dos estabilizadores do humor sobre animais tratados com OUA não está associado com sedação.

ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da administração de OUA [Crossings: $F(1,42) = 82.85$, $p < 0.001$; Rearings: $F(1,42) = 21.03$, $p < 0.001$; Visitas ao centro: $F(1,42) = 12.15$, $p = 0.001$; Grooming: $F(1,42) = 77.51$, $p < 0.001$; Sniffing: $F(1,42) = 1.71$, $p = 0.198$], e tratamento [Crossings: $F(2,42) = 59.24$, $p < 0.001$; Rearings: $F(2,42) = 31.02$, $p < 0.001$; Visitas ao centro: $F(2,42) = 24.76$, $p < 0.001$; Grooming: $F(2,42) = 101.63$, $p < 0.001$; Sniffing: $F(2,42) = 18.39$, $p < 0.001$], e a significância entre administração de OUA \times tratamento [Crossings: $F(2,42) = 58.41$, $p < 0.001$; Rearings: $F(2,42) = 25.65$, $p < 0.001$; Visitas ao centro: $F(2,42) = 28.34$, $p < 0.001$; Grooming: $F(2,42) = 98.78$, $p < 0.001$; Sniffing: $F(2,42) = 15.08$, $p < 0.001$].

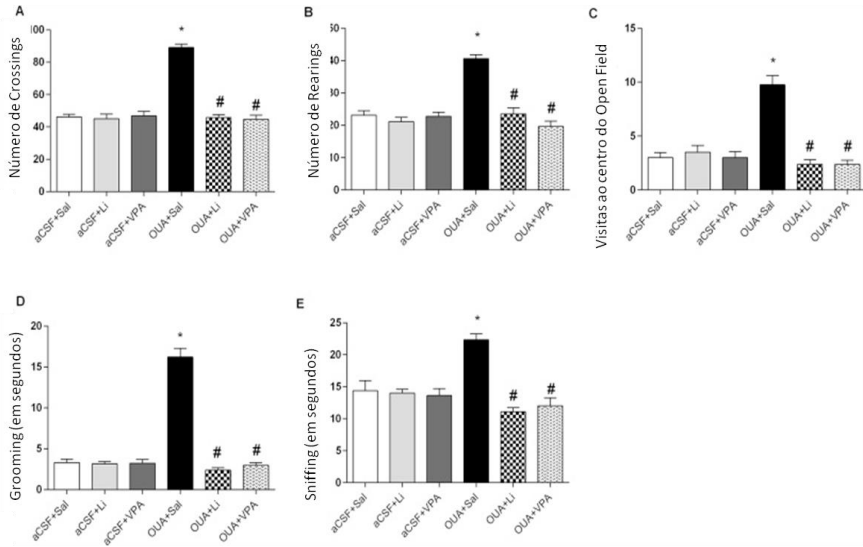


Figura 6: Efeitos da administração de Li e VPA sobre parâmetros comportamentais de animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. Os dados foram avaliados por análises de variância de duas vias, seguidos por teste de Duncan quando F foi significativo. Os valores foram expressos por média \pm D.P. * $p < 0.05$ comparado com o grupo aCSF + Sal. # $p < 0.05$ comparado com o grupo OUA. OUA = OUA, aCSF = líquido cefalorraquidiano artificial, Sal = Salina, Li = lítio, VPA = valproato.

Avaliação dos efeitos de Li e de VPA sobre os níveis totais e fosforilados de PI3K, Akt e GSK-3 β em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA

A **Figura 7A** mostra que a OUA diminuiu significativamente a fosforilação de PI3K no córtex frontal e hipocampo dos ratos. O tratamento com Li e VPA reverteu essas alterações no hipocampo, mas não no córtex frontal. O tratamento com Li sozinho aumentou a fosforilação de PI3K no córtex frontal. ANOVA de duas vias revelou significância dos efeitos de administração ICV de OUA [córtex frontal: $F(1,18) = 43.95$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1,18) = 6.06$, $p = 0.024$] e tratamento [córtex frontal: $F(2,18) = 6.21$, $p = 0.008$; hipocampo: $F(2,18) = 18.56$, $p < 0.001$] e significância entre administração de OUA x tratamento [córtex frontal: $F(2,18) = 8.71$, $p = 0.002$; hipocampo: $F(12,18) = 12.39$, $p < 0.001$].

Pode ser observado na **Figura 7B**, que a OUA diminuiu significativamente a fosforilação de Akt no córtex frontal e hipocampo dos ratos. Nos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido

por OUA, o tratamento com Li e VPA aumentou a fosforilação de Akt em ambas as estruturas, quando comparadas ao grupo controle. Em adição, o VPA sozinho diminuiu a fosforilação de Akt no hipocampo dos ratos. Dados com ANOVA de duas vias revelaram efeitos significativos de administração ICV de OUA [córtex frontal: $F(1.18) = 8.07$, $p = 0.01$; hipocampo: $F(1.18) = 11.88$, $p = 0.002$] e tratamento [córtex frontal: $F(2.18) = 22.33$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(2.18) = 7.73$, $p = 0.003$] e significância entre administração de OUA x tratamento [córtex frontal: $F(2.18) = 14.05$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(2.18) = 25.83$, $p < 0.001$].

A **Figura 7C** mostra que a fosforilação de GSK-3 β foi diminuída em todas as estruturas avaliadas nos ratos submetidos a administração de OUA. O tratamento com Li e VPA protegeu parcialmente sobre a diminuição da fosforilação de GSK-3 β induzida por OUA no córtex frontal. Entretanto, nos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA, o tratamento com Li e VPA aumentou a fosforilação de GSK-3 β em ambas as estruturas, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com Li *per se* diminuiu a fosforilação de GSK-3 β no córtex frontal, e Li e VPA *per se* aumentaram esses níveis no hipocampo. Dados com ANOVA de duas vias revelaram efeitos significativos de administração ICV de OUA [córtex frontal: $F(1.18) = 106.97$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(1.18) = 3.45$, $p = 0.079$] e tratamento [córtex frontal: $F(2.18) = 66.55$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(2.18) = 146.95$, $p < 0.001$] significância entre administração de OUA x tratamento [córtex frontal: $F(2.18) = 136.64$, $p < 0.001$; hipocampo: $F(2.18) = 28.29$, $p < 0.001$].

A **Figura 8** mostra efeitos da administração de Li e VPA através das bandas da técnica de *Western Blotting* referentes a fosforilação de PI3K (A), Akt (B) e GSK-3 β (C), em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.

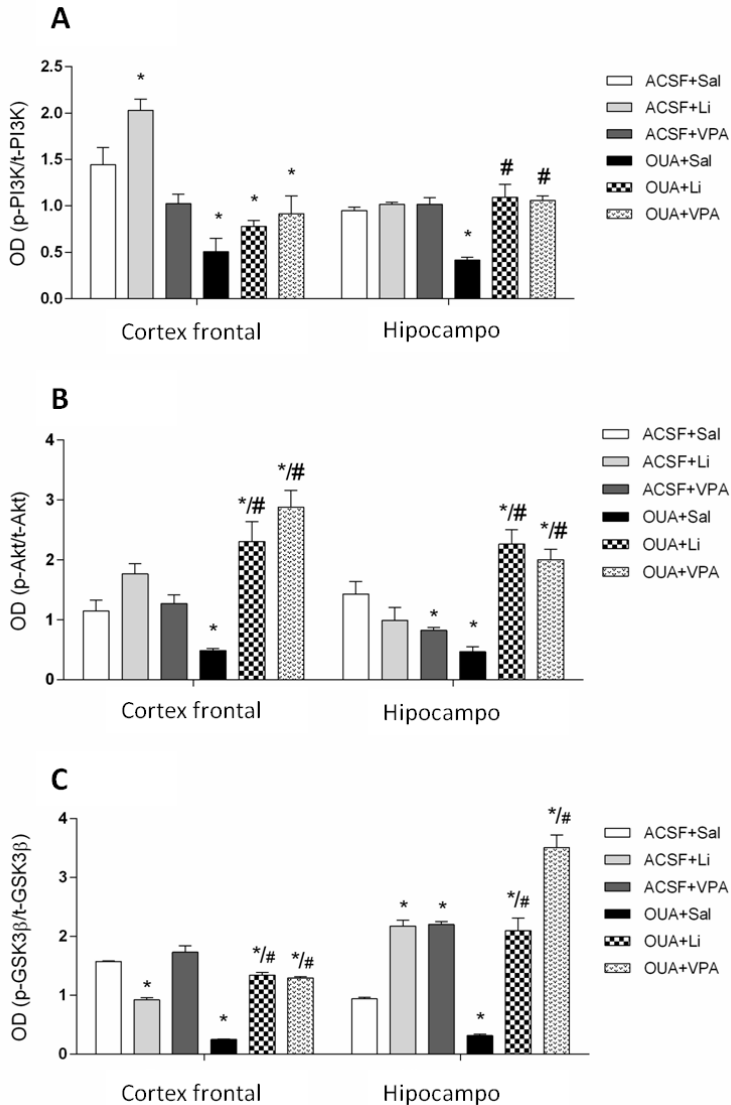


Figura 7: Efeitos da administração de Li e VPA sobre a fosforilação de PI3K (A), Akt (B) e GSK-3 β (C). Os dados foram avaliados por análises de variância de duas vias, seguidos por teste de Duncan quando F foi significativo. Os valores foram expressos por média \pm D.P. * $p < 0.05$ comparado com o grupo aCSF. # $p < 0.05$ comparado com o grupo OUA. OUA = OUA, aCSF = líquido cefalorraquidiano artificial, Sal = Salina, Li = lítio, VPA = valproato.

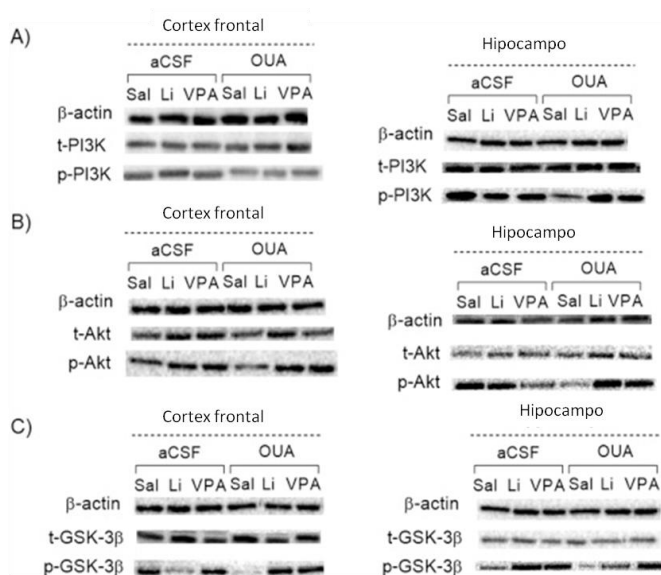


Figura 8: Efeitos da administração de Li e VPA através das Bandas de Western Blotting sobre a fosforilação de PI3K (A), Akt (B) e GSK-3β (C). Fosforilação de PI3K (A), Akt (B) e GSK-3β (C) em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.

Avaliação dos efeitos de Li e de VPA sobre os níveis totais e fosforilados de MAPK em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA

Conforme mostra a **Figura 9**, não houve alterações na fosforilação da MAPK em nenhuma das estruturas avaliadas. Dados com ANOVA de duas vias não revelaram efeitos significativos de administração ICV de OUA [córtex frontal: $F(1,17) = 2.65$, $p = 0.121$; hipocampo: $F(1,18) = 1.54$, $p = 0.230$], tratamento [córtex frontal: $F(2,17) = 1.20$, $p = 0.323$; hipocampo: $F(2,18) = 0.55$, $p = 0.582$] ou administração de OUA x tratamento [córtex frontal: $F(2,17) = 3.43$, $p = 0.055$; hipocampo: $F(2,18) = 0.49$, $p = 0.619$]. A **Figura 10** mostra os efeitos da administração de Li e VPA através das bandas da técnica de *Western Blotting*, referentes a fosforilação de MAPK, em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.

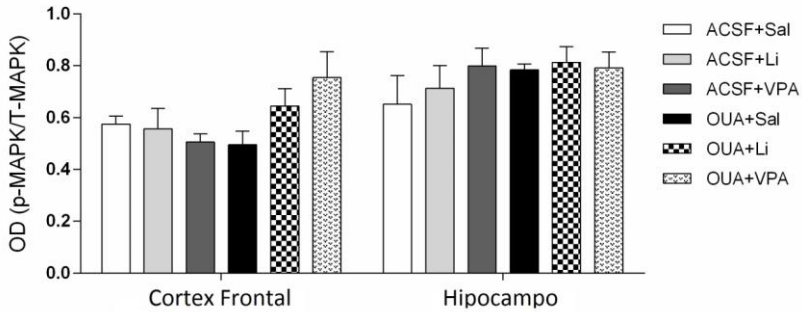


Figura 9: Efeitos da administração de Li e VPA sobre a fosforilação de MAPK em córtex frontal e hipocampo de ratos. Os dados foram avaliados por análises de variância de duas vias, seguidos por teste de Duncan quando F foi significativo. Os valores foram expressos por média \pm D.P. * $p < 0.05$ comparado com o grupo aCSF. # $p < 0.05$ comparado com o grupo OUA. OUA = OUA, aCSF = líquido cefalorraquidiano artificial, Sal = Salina, Li = lítio, VPA = valproato.

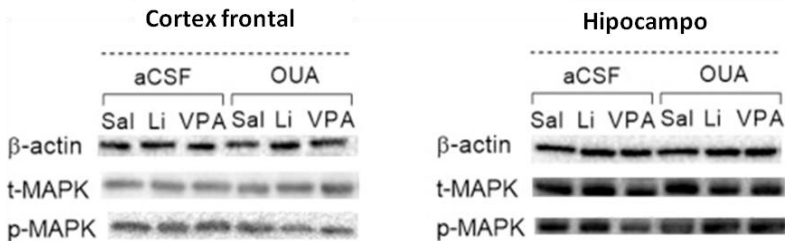


Figura 10: Efeitos da administração de Li e VPA através das Bandas de Western Blotting sobre a fosforilação de MAPK. Fosforilação de MAPK em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.

Posteriormente, foi analisada a correlação entre a atividade locomotora e a fosforilação de PI3K (**Figura 11A**), Akt (**Figura 11B**), GSK-3 β (**Figura 11C**) e MAPK (**Figura 11D**). Para avaliar esta correlação, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. A atividade locomotora foi negativamente correlacionada com a fosforilação de PI3K no hipocampo, e com a fosforilação de Akt e GSK-3 β em todas as estruturas avaliadas. A atividade locomotora não demonstrou correlação com a fosforilação de MAPK. Dados da correlação de Pearson para:

[córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.1616$; $p = 0.0515$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.2396$; $p = 0.015$), Akt: [córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.3793$; $p = 0.0014$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.699$; $p < 0.001$), GSK-3 β : [córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.6212$; $p < 0.001$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.4069$; $p < 0.001$)] e MAPK: [córtex frontal (n = 24; $r^2 = 0.01099$; $p = 0.63$), hipocampo (n = 24; $r^2 = 0.007827$; $p = 0.68$).

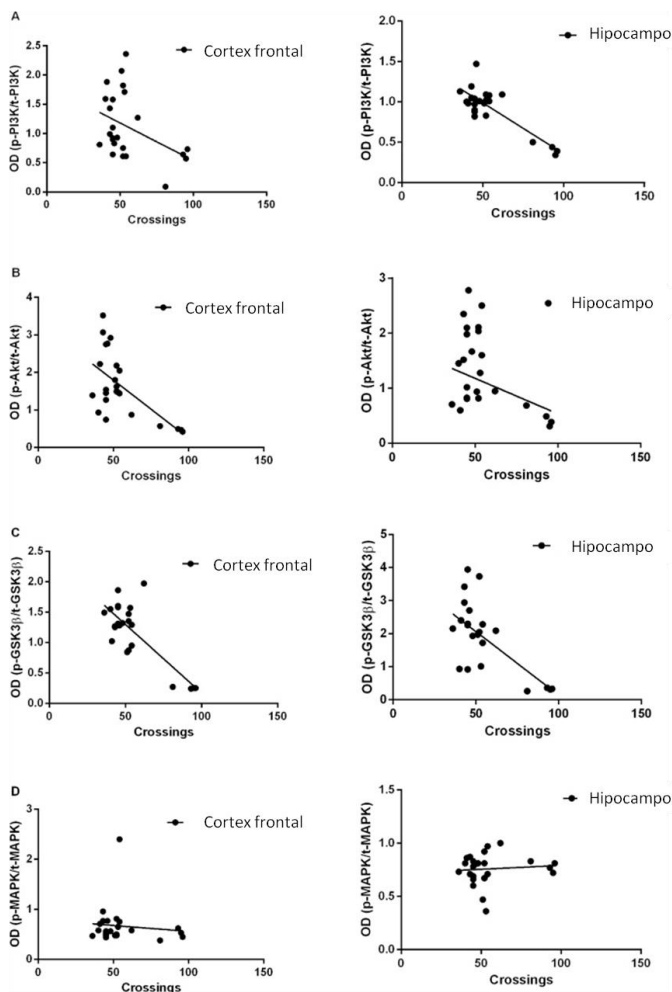


Figura 11: Correlação entre atividade locomotora e fosforilação de PI3K, Akt, GSK-3 β , e MAPK. Correlação entre atividade locomotora (crossings) e PI3K (A), Akt (B), GSK-3 β (C) e MAPK (D) em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

Avaliação dos efeitos do AR-A014418 sobre a atividade locomotora de ratos Wistar em um modelo de mania induzido pela administração de OUA

A fim de avaliar a hipótese de que GSK-3 β é um importante alvo para os efeitos terapêuticos do Li e do VPA, foi avaliado os efeitos do AR-A014418 (um inibidor de GSK-3) sobre os efeitos do tipo maníaco induzidos pela OUA. Pode ser observado na figura 10, a administração de AR-A014418 também reverteu o aumento do número de *crossings* e *rearings* induzidos pela OUA. É importante observar que, o AR-A014418 sozinho, não afetou a locomoção dos animais, indicando que os efeitos dessa substância não está associado com sedação. Dados com ANOVA de duas vias revelaram efeitos significativos de administração ICV de OUA [Crossings: F (1.24) = 38.87, $p < 0.001$; Rearings: F (1.24) = 21.17, $p = 0.001$] e tratamento [Crossings: F (1.24) = 9.94, $p = 0.004$; Rearings: F (1.24) = 4.33, $p = 0.048$] significância entre administração de OUA x tratamento [Crossings: F (1.24) = 9.49, $p = 0.0051$; Rearings: F (1.24) = 12.16, $p = 0.0019$].

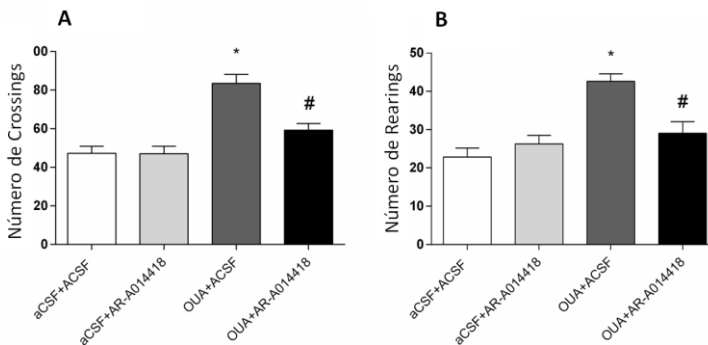


Figura 12: Efeitos da administração de AR-A014418 sobre a atividade locomotora de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. Os dados foram avaliados por análises de variância de duas vias, seguidos por teste de Duncan quando F foi significativo. Os valores foram expressos por média \pm D.P. * $p < 0.05$ comparado com o grupo aCSF. # $p < 0.05$ comparado com o grupo OUA.

5 DISCUSSÃO

A OUA (um inibidor seletivo da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$), quando administrada em ratos, induz comportamento do tipo maníaco, e por isso esse vem sendo proposto como um bom modelo animal de mania (Machado-Vieira et al., 2004; Valvassori et al., 2013). Alterações na $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ tem sido sugerido como um ponto crucial na fisiopatologia do TB. Vários estudos clínicos mostraram a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ diminuída em mania aguda, quando comparados com pacientes bipolares eutímicos (Hesketh et al., 1977; Naylor et al., 1980; Reddy et al., 1992). Um estudo prévio sugeriu que melhoras clínicas observadas em pacientes bipolares está relacionada com melhoras na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Johnston et al., 1980). No presente estudo, foi possível reproduzir o modelo animal de mania induzido por OUA, caracterizado pela hiperatividade. Foi demonstrado aumento da atividade locomotora (*crossings*), exploratória (*rearings*), comportamento do tipo estereotípico (*grooming* e *sniffing*) e comportamento de risco (visitas ao centro do *open field*). Todas essas alterações comportamentais induzidas pela OUA foram revertidas pelos estabilizadores do humor, Li e VPA. Em adição, foi mostrado que Li e VPA agem sobre a via de sinalização de GSK-3 β para reverter o comportamento do tipo maníaco induzido pela OUA.

Estudos com esse modelo animal tem demonstrado que a hiperatividade induzida pela OUA está associada com alterações cerebrais similares aquelas observadas no TB. Um estudo pré-clínico anterior demonstrou que o comportamento do tipo maníaco induzido pela OUA foi acompanhado de stress oxidativo e de ativação de vias de morte celular (Valvassori et al., 2015). Neste estudo anterior, Valvassori e colaboradores (2015) demonstraram que a OUA aumentou a produção de superóxido em partículas submitocondriais, peroxidação lipídica, p53, Bax e diminuiu Bcl-2, sugerindo que a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ está relacionada com a morte neuronal, observada no TB. No presente estudo, a OUA induziu uma diminuição significativa dos níveis de fosforilação de GSK-3 β , enzima a qual está associada com apoptose e morte neuronal. É importante enfatizar que a GSK-3 β está normalmente ativa nas células, e é desativada quando fosforilada (Li and Jope, 2010). No presente estudo, também foi demonstrado que a OUA diminui os níveis de fosforilação de PI3K e Akt, moléculas responsáveis pela desativação de GSK-3 β . Juntos, esses estudos reforçam a ligação entre diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e morte neuronal, ambos observados na fisiopatologia do TB.

Em contrapartida, no estudo de Yu e colaboradores (2010) foi visto que a OUA 10^{-3} M induziu uma diminuição significativa na fosforilação de Akt no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos. Além disso, no mesmo artigo, os autores mostraram que a administração ICV de OUA 10^{-3} M diminuiu a fosforilação de GSK-3 β . Essa diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato de que os autores acima citados utilizaram uma metodologia diferente da que foi empregada no presente estudo. Yu e seus colaboradores avaliaram os efeitos da OUA após 1, 2, 4 e 8 horas após a administração ICV e no presente estudo, foi avaliado os efeitos da OUA sete dias após uma única administração ICV. Um estudo anterior demonstrou que OUA 10^{-2} e 10^{-3} M induziu hiperatividade imediatamente após a administração ICV, e essa resposta permaneceu durante sete dias (Riegel et al., 2009). Ruktanonchai et al. (1998) observaram que a hiperatividade em ratos persistiu nove dias após uma única injeção ICV de OUA. A partir desses resultados, pode-se sugerir que os efeitos agudos da OUA podem aumentar a fosforilação de Akt e GSK-3 β , enquanto que os efeitos em longo prazo da OUA podem diminuir a fosforilação de Akt e de GSK-3 β .

Muitos dos efeitos da OUA são observados em pacientes bipolares, incluindo: diminuição de BDNF, alterações de funções mitocondriais e estresse oxidativo (Jornada et al., 2010, 2011; Kim et al., 2012; Valvassori et al., 2015; Lopes-Borges et al., 2015). Estudos tem demonstrado que o estresse oxidativo favorece a ativação de GSK-3 (Dokken et al., 2008; Venè et al., 2014). Além disso, estudos pré-clínicos anteriores demonstraram que fármacos antioxidantes conseguem aumentar a fosforilação de GSK-3, inativando essa enzima (Valencia et al., 2012). Dados da literatura demonstram que a OUA induz estresse oxidativo em cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania, como também descrevem que a OUA aumenta a produção de superóxido, peroxidação de proteínas, peroxidação lipídica no tecido e em partículas submitocondriais em córtex frontal e hipocampo de ratos (Riegel et al., 2009, 2010; Valvassori et al., 2015). Em adição, foi demonstrado que a OUA altera enzimas antioxidantes, incluindo diminuição da atividade de catalase e aumento na atividade de superóxido dismutase (SOD) (Riegel et al., 2010; Jornada et al., 2011). Portanto, pode-se sugerir que o estresse oxidativo induzido pela OUA pode estar ativando a via de sinalização de GSK-3 β , em outras palavras, diminuindo a fosforilação desta enzima.

No presente estudo *Li per se* diminuiu a fosforilação de GSK-3 β no córtex frontal dos ratos, mas não no hipocampo. Em concordância com os resultados do presente estudo, um estudo anterior demonstrou que a administração de *Li* diminuiu os níveis totais de GSK-3 β em córtex

frontal de ratos (Cechinel-Recco et al., 2012). Alguns estudos anteriores demonstram que, dependendo do tempo de tratamento e da estrutura cerebral avaliada, Li *per se* pode alterar enzimas antioxidantes. Frey e colaboradores (2006) mostraram que o tratamento com Li durante sete dias diminuiu a atividade de SOD no hipocampo e aumentou a atividade dessa enzima no córtex frontal. Por outro lado, 14 dias de tratamento com esse estabilizador do humor diminuiu a atividade de SOD no córtex frontal. Uma possível explicação que justifique o Li *per se* diminuir a fosforilação de GSK-3, é que o Li poderia, em algumas situações, induzir estresse oxidativo e, conseqüentemente, diminuir a fosforilação de GSK-3 β .

Diferente dos resultados do presente estudo, Kozlovsky et al. (2003) demonstrou que o tratamento com Li e VPA durante 11 dias não alterou os níveis de GSK-3 β no córtex frontal de ratos. Essa discrepância pode ser explicada, pelo menos em parte, pela diferença entre as metodologias aplicadas entre os estudos. No presente estudo, a administração de Li e VPA foi de forma i.p., e no estudo do grupo de Kozlovsky, o Li foi administrado na ração e o VPA na água dos animais. É importante enfatizar que no presente estudo todos os animais tratados com Li tiveram os níveis plasmáticos de Li entre 0,6 e 1,2 mEq/L, conforme recomendado no tratamento para TB.

Em relação às respostas comportamentais, o presente estudo mostrou que o comportamento do tipo maníaco induzido pela OUA foi acompanhado pela diminuição da fosforilação de GSK-3 β no hipocampo e córtex frontal dos animais. É importante enfatizar que a atividade locomotora foi negativamente correlacionada com a fosforilação de PI3K, Akt e GSK-3 β . Estudos anteriores demonstraram que a GSK-3 β exerce um papel importante no comportamento do tipo maníaco induzido pela estimulação de receptores de dopamina (DA), e que a sua inibição interfere na expressão de comportamentos dependentes de DA (Beaulieu et al., 2004). Beaulieu e sua equipe (2004) demonstraram que, em cérebro de camundongos DA transporter *knock-out*, os elevados níveis de DA levam a ativação de GSK-3 β e redução de Akt, através da cascata de sinalização envolvendo receptores da classe D2. Em adição, eles encontraram alterações similares na atividade de Akt e GSK-3 após administração aguda de anfetamina em camundongos do tipo selvagem. É interessante salientar que Sui et al. (2013) demonstraram que a administração ICV de OUA aumenta a liberação de DA no córtex frontal. Além disso, estudos anteriores demonstraram que OUA aumenta significativamente os níveis de DA no estriado e em fatias corticais de cérebros de ratos (Boireau et al., 1998; Obata, 2006; Diniz et al., 2007; Silva et al., 2007). Esses estudos

mostram que a inibição sinaptossomal da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ pela OUA aumenta o Na^+ intracelular, e assim é capaz de induzir a liberação de DA a partir do citoplasma através do transporte reverso de *dopamine active transporter* (DAT) (Milusheva et al., 1996; Leviel, 2001). Portanto, pode-se sugerir que, talvez, o aumento de DA induzido pela OUA pode induzir alterações na via de GSK-3 β observada no presente estudo.

A respeito dos efeitos dos estabilizadores do humor sobre a via de sinalização de GSK-3 β ; no presente estudo, o tratamento com Li e VPA aumenta a fosforilação de Akt e GSK-3 β , que foi diminuída pelos efeitos da OUA em córtex frontal e hipocampo de ratos. Em adição, Li e VPA reverteram a diminuição da expressão de PI3K induzida pela OUA no hipocampo. Já a MAPK não apresentou alterações em nenhum tratamento e estruturas avaliadas. Atualmente, é descrito na literatura que Li e VPA podem ter tanto efeitos diretos quanto indiretos sobre a GSK-3 e vias de sinalizações reguladas por essa enzima (Zarate et al., 2006). Cechinel-Recco e sua equipe (2012) demonstraram que Li reverteu a fosforilação diminuída de GSK-3 em córtex frontal, hipocampo, estriado, e amígdala em ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por anfetamina. Estudos pré-clínicos demonstraram que a administração crônica de Li modifica a afinidade de transportadores de DA, diminuindo assim a super-transmissão desse neurotransmissor (Carli et al., 1997). Além disso, uma inibição genética ou farmacológica da GSK-3 reproduz efeitos de estabilizadores do humor e reduz respostas comportamentais de transmissão dopaminérgica - farmacologicamente ou geneticamente elevada (Beaulieu et al., 2004). Levando em consideração que a OUA aumenta os níveis de DA no cérebro de ratos (Boireau et al., 1998; Obata, 2006; Diniz et al., 2007; Silva et al., 2007), pode-se sugerir que o Li pode agir sobre a hiperatividade induzida pela OUA através da diminuição da transmissão dopaminérgica.

Um estudo anterior *in vitro*, utilizando células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), avaliou os efeitos do VPA sobre os estados fosforilados de Akt e de GSK-3 β . Foi demonstrado que o VPA aumentou a fosforilação de Akt e de GSK-3 β (De Sarno et al., 2002). Em adição, Xing et al. (2015) demonstraram que o VPA inibe a hiperatividade induzida pela meta-anfetamina através da sinalização de GSK-3 β . É interessante que no presente estudo, o inibidor específico de GSK-3 β , AR-A014418, demonstrou efeitos do tipo antimaníaco sobre a hiperatividade induzida pela OUA nos ratos. Um estudo anterior demonstrou que o tratamento com AR-A014418 resultou na redução da hiperatividade induzida por anfetamina em ratos (Gould et al., 2004).

Juntos esses estudos sugerem que os efeitos terapêuticos dos estabilizadores do humor podem ser, pelo menos em parte, através da sinalização de GSK-3 β .

É importante salientar, que no presente estudo, Li e VPA não reverteram a diminuição da fosforilação de PI3K induzida pela OUA no córtex frontal dos ratos, contudo, esses fármacos aumentaram a fosforilação de Akt nessa estrutura. Essa discrepância pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de que a Akt também é fosforilada por outros mediadores, como por exemplo, mTORC2 (targeting of rapamycin complex 2) (Guertin et al., 2006; Bozulis e Hemmings, 2009; Sarbassov et al., 2005). Um estudo anterior demonstrou que o Li atenuou a diminuição da fosforilação de mTOR, Akt e GSK-3 β induzida por anfetamina (Wu et al., 2015). Em adição, Teng et al., (2010) mostrou que mioblastos C2C12 tratados com VPA aumentaram a fosforilação de mTOR e Akt. Portanto, pode-se sugerir que no presente estudo Li e VPA podem aumentar a fosforilação de Akt no córtex frontal através da ativação da via de sinalização de mTOR **(ver Figura 13)**.

A GSK-3 é encontrada principalmente no citosol, entretanto, essa enzima também está presente nas mitocôndrias e no núcleo, assim como em outros compartimentos celulares. A GSK-3 mitocondrial possui um papel importante no estresse oxidativo e em certas condições apoptóticas (Bijur and Jope, 2003; King et al., 2001). De fato, Yan e sua equipe (2015) mostraram que GSK-3 induz fragmentação mitocondrial através da fosforilação de Drp1 (*Dynamin-related protein 1*). O mesmo estudo mostrou que o bloqueio de GSK-3 β mediado pela fosforilação de Drp1 promove proteção de células neuronais. A mitocôndria exerce um importante papel sobre o estresse oxidativo, resiliência celular e vias de morte celular. Tem sido descrito na literatura que disfunções mitocondriais estão relacionadas com neuroprogressão e dano cognitivo, ambos observados em pacientes bipolares (Scaini et al., 2016).

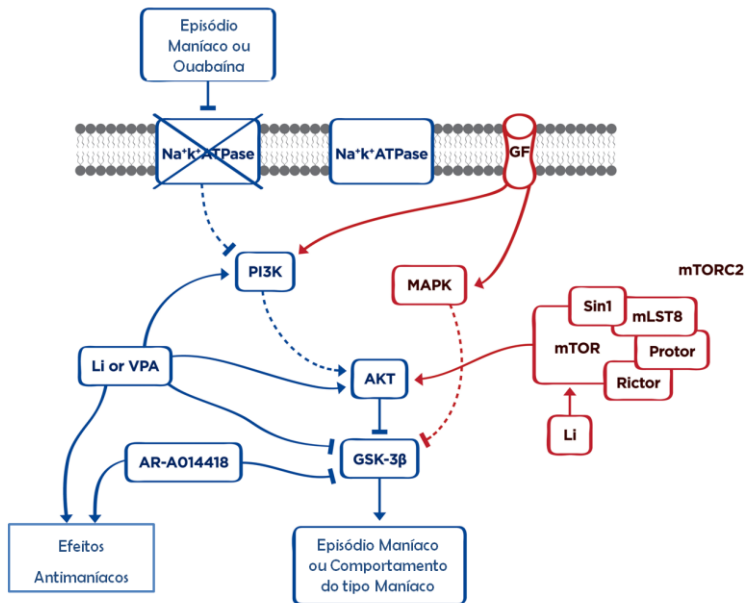


Figura 13: Vias de sinalização de GSK-3 β . Naturalmente, a PI3K fosforila a Akt, que por sua vez inibe a GSK-3 β . Quando ocorre uma alteração na Na⁺K⁺ATPase (como em um episódio maníaco ou através da administração de OUA), ocorre uma diminuição da fosforilação de PI3K, que consequentemente diminui a fosforilação de Akt, favorecendo a ativação de GSK-3 β . O tratamento com Li e VPA (os quais agem sobre PI3K, Akt e GSK-3 β) promove efeitos antimaníacos. A administração de AR-A014418 também provoca efeitos antimaníacos. Especula-se que o Li age através da via mTOR, agindo indiretamente sobre GSK-3 β . Outra via de sinalização que pode regular GSK-3 β é a via da MAPK. Manic episode = Episódio maníaco; Ouabain = OUA; Antimanic effects = Efeitos antimaníacos; Manic-like behavior = comportamento do tipo maníaco.

Alguns estudos deste grupo de pesquisa mostraram que a OUA altera funções mitocondriais, e que Li e VPA revertem essas alterações (Riegel et al., 2009; Valvassori et al., 2015). Portanto, no presente estudo os estabilizadores do humor podem ter protegido as funções mitocondriais através da inibição da via de GSK-3 β .

Levando em consideração que o estresse oxidativo pode ser induzido pela OUA e também ativar a GSK-3, vários estudos tem mostrado os efeitos antioxidantes do Li e VPA (Cui et al., 2007; Valvassori et al., 2015). Cui et al. (2007) demonstrou que a glutatona possui um papel

importante nos efeitos neuroprotetores de Li e VPA sobre o dano oxidativo. Em adição, Li e VPA foram capazes de reverter a peroxidação lipídica e alterações na atividade de SOD em córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA (Valvassori et al., 2015). Jornada et al. (2011) demonstraram que Li e VPA revertem e previnem a produção de superóxido e peroxidação lipídica no tecido total e em partículas submitocondriais em cérebros de ratos submetidos ao modelo animal de mania. No mesmo estudo, os autores também observaram que Li e VPA revertem e previnem a peroxidação proteica e alterações em enzimas antioxidantes em cérebro de ratos que receberam administração de OUA (Jornada et al., 2011). Portanto, pode-se sugerir que Li e VPA podem reverter alterações na via de sinalização de GSK-3 β por agir sobre o estresse oxidativo induzido pela OUA.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, foi mostrada a importância da relação entre comportamento do tipo-maníaco e alterações na via de sinalização de GSK-3 β induzidos pela OUA. Além disso, o tratamento com Li e VPA preveniu o comportamento do tipo maníaco, enquanto protegeu o cérebro das alterações causadas na via de sinalização de GSK-3 β . Portanto, pode-se sugerir que a inibição da Na⁺K⁺ATPase, observada em pacientes bipolares, pode estar associada com alterações na via de sinalização de GSK-3 β . Em adição, foram fornecidas evidências adicionais sobre o envolvimento da via de sinalização de GSK-3 β nos efeitos terapêuticos de Li e VPA.

REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Washington, DC; 2013.
- Arent CO, Valvassori SS, Fries GR, Stertz L, Ferreira CL, Lopes-Borges J, Mariot E, Varela RB, Ornell F, Kapczinski F, Andersen ML, Quevedo J. Neuroanatomical profile of antimaniac effects of histone deacetylases inhibitors. *Mol Neurobiol*. 2011 Jun;43(3):207-14.
- Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *Embo J*. 1992;11:3469-79.
- Bayascas JR. Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cells cycle*. 2008;7(19):2978-82.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):5099-104.
- Bega S, Schaffer A, Goldstein B, Levitt A. Differentiating between Bipolar Disorder Types I and II: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *J Affect Disord*. 2012; 138(1-2):46-53
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015 Apr;148:114-31.
- Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*. 2003 Dec 19;14(18):2415-9.
- Boireau A, Meunier M, Imperato A. Ouabain-induced increase in dopamine release from mouse striatal slices is antagonized by riluzole. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50(11):1293–1297.

Bozulic L, Hemmings BA. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):256-61.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296:1655–1657.

Carli M, Morissette M, Hébert C, Di Paolo T, Reader TA. Effects of a chronic lithium treatment on central dopamine neurotransmitters. *Biochem Pharmacol.* 1997 Aug 1;54(3):391-7.

Cechinel-Recco K, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Arent CO, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J. Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. *J Psychopharmacol.* 2012.

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

Cohen P, Alessi DR, Cross DAE. PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Letters.* 1997;410:3-10.

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

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

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

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

Cui J, Shao L, Young LT, Wang JF. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience.* 2007 Feb 23;144(4):1447-53.

Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem.* 1999;274:1865-8.

De Sarno P, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology.* 2002 Dec;43(7):1158-64.

Diniz PH, Silva JH, Gomez MV, Guatimosim C, Gomez RS. Halothane increases non vesicular [(3)H] dopamine release from brain cortical slices. *Cell Mol Neurobiol* 2007. 27(6):757-770.

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

Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ, Am J. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008. 294 (3), pp. E615-E621.

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

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

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

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, Sep;31(5):326-32.

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

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

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

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell.* 2006 Dec;11(6):859-71.

Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, Sobue K. Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1999 May 17;145(4):727-40.

Hennion JP, el-Masri MA, Huff MO, el-Mailakh RS. Evaluation of neuroprotection by lithium and valproic acid against ouabain-induced cell damage. *Bipolar Disord.* 2002 Jun;4(3):201-6

Hesketh JE, Glen AI, Reading HW. Membrane ATPase activities in depressive illness. *J. Neurochem.*,1977. 28, pp. 1401–1402.

Huang X, Huang K, Zheng W, Beveridge TJ, Yang S, Li X, Li P, Zhou W, Liu Y. The effects of GSK-3 β blockade on ketamine self-administration and relapse to drug-seeking behavior in rats. *Drug Alcohol Depend.* 2015 Feb 1;147:257-65.

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

Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Front Mol Neurosci.* 2011 Aug 9;4:16.

Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers

on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J. Psychiatr. 2010. Res.*, 44 (8), pp. 506–510.

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

Kapczinski F, Quevedo J. *Transtorno Bipolar: Teoria e Clínica*. – 2. Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016. 320 p.

Kim AH, Parker EK, Williamson V, McMichael GO, Fanous AH, Vladimirov VI. Experimental validation of candidate schizophrenia gene ZNF804A as target for hsa-miR-137

King TD, Bijur GN, Jope RS. Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. *Brain Res.* 2001 Nov 16;919(1):106-14.

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

Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. Low GSK-3beta immunoreactivity in postmortem frontal cortex of schizophrenic patients. *Am J Psychiatry.* 2000, May;157(5):831-3.

Kozlovsky N, Nadri C, Belmaker RH, Agam G. Lack of effect of mood stabilizers or neuroleptics on GSK-3 protein levels and GSK-3 activity. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003 Jun;6(2):117-20.

Leviel V. The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int.* 2001 Feb;38(2):83-106.

Li X, Jope RS. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacology*, Oct 2010. 35 (11), pp. 2143–2154.

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

Liu X, Yao Z. Chronic over-nutrition and dysregulation of GSK3 in diseases. *Nutr Metab (Lond)*. 2016 Aug 4;13:49.

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

Lopes-Borges J, Valvassori SS, Varela RB, Tonin PT, Vieira JS, Gonçalves CL, Streck EL, Quevedo J. Histone deacetylase inhibitors reverse manic-like behaviors and protect the rat brain from energetic metabolic alterations induced by ouabain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2015 128, pp. 89–95.

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

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

Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA Jr. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord*. 2009 Jun;11 Suppl 2:92-109.

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

Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE, Zarkov Z. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(3):241-51.

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

Milusheva EA, Dóda M, Baranyi M, Vizi ES. Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and [Ca²⁺]_o-dependent and independent release of [3H]dopamine in rat striatal slices. *Neurochem Int*. 1996 May-Jun;28(5-6):501-7.

Mitchell PB, Johnston AK, Frankland A, Slade T, Green MJ, Roberts G, Wright A, Corry J, Hadzi-Pavlovic D. Bipolar Disorder in a national survey using the World Mental Health Version of the Composite International Diagnostic Interview: the impact of differing diagnostic algorithms. *Acta Psychiatr Scand.* 2013;127:381-93.

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

Obata T. Diltiazem, a L-type calcium channel antagonist, suppresses ouabain-enhanced dopamine efflux by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP?) in rat striatum. *Biochim Biophys Acta* 2006. 1760(5):721–723.

Okano J, Gaslightwala I, Birnbaum MJ, Rustgi AK, Nakagawa H. Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30934-42.

Pernice HF, Schieweck R, Kiebler MA, Popper B. mTOR and MAPK: from localized translation control to epilepsy. *BMC Neurosci.* 2016 Nov 17;17(1):73.

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

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

Ribeiro, M.; Laranjeira, R.; Cividanes, G. Transtorno bipolar do humor e uso indevido de substâncias psicoativas *Rev. Psiq. Clín.* 32, supl 1; 78-88, 2005.

Riegel RE, Valvassori SS, Elias G, Réus GZ, Steckert AV, de Souza B, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Animal model of mania induced by ouabain: Evidence of oxidative stress in submitochondrial particles of the rat brain. *Neurochem Int.* 2009 Dec;55(7):491-5.

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

Rosa AR, Marco M, Fachel JM, Kapczinski F, Stein AT, Barros HM. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. Correlation between drug treatment adherence and lithium treatment attitudes and knowledge by bipolarpatients. 2007 Jan 30;31(1):217-24.

Ruktanonchai DJ, El-Mallakh RS, Li R, Levy RS. Persistent hyperactivity following a single intracerebroventricular dose of ouabain. *Physiol. Behav.*, 1988. 63 (3), pp. 403–406.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.

Schizophr. Res. 2012. 141 (1), pp. 60–64.

Scaini G, Rezin GT, Carvalho AF, Streck EL, Berk M, Quevedo J. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: Evidence, pathophysiology and translational implications. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016 Sep;68:694-713.

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J.* 1995;305:25-8.

Silva JH, Gomez RS, Diniz PH, Gomez MV, Guatimosim C. The effect of sevoflurane on the release of [3H]dopamine from rat brain cortical slices. *Brain Res Bull* 2007; 72(4–6):309–314.

Su P, Li S, Chen S, Lipina TV, Wang M, Lai TK, Lee FH, Zhang H, Zhai D, Ferguson SS, Nobrega JN, Wong AH, Roder JC, Fletcher PJ, Liu F. A dopamine D2 receptor-DISC1 protein complex may contribute to antipsychotic-like effects. *Neuron.* 2014 Dec 17;84(6):1302-16.

Sui L, Song XJ, Ren J, Ju LH, Wang Y. Intracerebroventricular administration of ouabain alters synaptic plasticity and dopamine release

in rat medial prefrontal cortex. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013 Aug;120(8):1191-9.

Summers SA, Whiteman EL, Cho H, Lipfert L, Birnbaum MJ. Differentiation-dependent suppression of platelet-derived growth factor signaling in cultured adipocytes. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):23858-67.

Takuwa N, Fukui Y, Takuwa Y. Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1346-58.

Teng HF, Kuo YL, Loo MR, Li CL, Chu TW, Suo H, Liu HS, Lin KH, Chen SL. Valproic acid enhances Oct4 promoter activity in myogenic cells. *J Cell Biochem*. 2010 Jul 1;110(4):995-1004.

Valencia A, Sapp E, Reeves PB, Alexander J, Masso N, Li X, Kegel KB, DiFiglia M. Reagents that block neuronal death from Huntington's disease also curb oxidative stress *Neuroreport*, 2012. 23 (1), pp. 10–15.

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), pp. S121–S131.

Valvassori SS, Dal-Pont GC, Resende WR, Jornada LK, Peterle BR, Machado AG, Farias HR, de Souza CT, Carvalho AF, Quevedo J. Lithium and valproate act on GSK-3 β signaling pathway to reverse the manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. *Neuropharmacology*. 2016 Oct 24. pii: S0028-3908(16)30465-8.

Valvassori SS, Resende WR, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on oxidative stress-induced cell death signaling pathways in the brains of rats subjected to the ouabain-induced animal model of mania: mood stabilizers exert protective effects against ouabain-induced activation of the cell death pathway. *J. Psychiatr. Res.*, Jun. 2015. 65, pp. 63–70.

Venè R, Cardinali B, Arena G, Ferrari N, Benelli R, Minghelli M, Poggi A, Noonan DM, Albin A, Tosetti F. Glycogen synthase kinase 3 regulates cell death and survival signaling in tumor cells under redox stress *Neoplasia*. 2014. 16 (9), pp. 710–722.

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

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):489-501.

White MF, Kahn CR. Insulin signaling system. *J Biol Chem.* 1994;269:1-4.

Wu J, Zhu D, Zhang J, Li G, Liu Z, Sun J. Lithium protects against methamphetamine induced neurotoxicity in PC12 cells via Akt/GSK3 β /mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Sep 25;465(3):368-73.

Xing B, Liang XP, Liu P, Zhao Y, Chu Z, Dang YH. Valproate Inhibits Methamphetamine Induced Hyperactivity via Glycogen Synthase Kinase 3 β Signaling in the Nucleus Accumbens Core. *PLoS One.* 2015 Jun 1;10(6):e0128068.

Xue Z, Li B, Gu L, Hu X, Li M, Butterworth RF, Peng L. Increased Na, K-ATPase alpha2 isoform gene expression by ammonia in astrocytes and in brain in vivo. *Neurochem Int.* 2010 Nov;57(4):395-403.

Yan J, Liu XH, Han MZ, Wang YM, Sun XL, Yu N, Li T, Su B, Chen ZY. Blockage of GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2015 Jan;36(1):211-27.

Yu HS, Kim SH, Park HG, Kim YS, Ahn YM. Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: a rat model for mania. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 34 (6) (2010 Aug 16), pp. 888–894.

Zarate CA Jr, Singh J, Manji HK. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2006 Jun 1;59(11):1006-20.

Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Dimascio LN, Ilkayeva O, Kelekar A, Reya T, Rathmell JC. Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a

glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol.* 2007 Jun;27(12):4328-39. Epub 2007 Mar 19.

Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):8027-31.

ANEXOS

ANEXO A

Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.



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

CERTIFICADO

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

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

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

Protocol number: 001/2016-1


Principal Investigator: Samira da Silva Valvassori

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

Project title: “Effects Of Lithium Or Valproate On $\text{Pi3k/Akt/Gsk-3}\beta$ signaling Pathway In An Animal Model Of Mania Induced By Ouabain”.

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

Criciúma, 23 de fevereiro de 2016.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA