

**Dissertação de Mestrado**

**RESVERATROL PROTEGE O CÉREBRO DE RATOS  
CONTRA O DANO OXIDATIVO EM UM MODELO  
ANIMAL DOPAMINÉRGICO DE MANIA**

**SAMIRA MENEGAS PEREIRA**



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

**SAMIRA MENEGAS PEREIRA**

**RESVERATROL PROTEGE O CÉREBRO DE RATOS  
CONTRA O DANO OXIDATIVO EM UM MODELO  
ANIMAL DOPAMINÉRGICO DE MANIA**

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  
DEZEMBRO, 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P436r Pereira, Samira Menegas.

Resveratrol protege o cérebro de ratos contra o dano oxidativo em um modelo animal dopaminérgico de mania / Samira Menegas Pereira – 2017.

70 p. : il.; 21 cm.

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

Orientação: Samira da Silva Valvassori.

1. Resveratrol – Uso terapêutico. 2. Transtorno bipolar - Tratamento. 3. Anfetamina. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

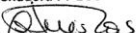
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005


ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 299

Com início às 14h00 (quatorze horas) do dia quatorze do mês de dezembro de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Samira Menegas Pereira**, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Samira da Silva Valvassori, intitulada "**RESVERATROL PROTEGE O CÉREBRO DE RATOS CONTRA O DANO OXIDATIVO EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA DOPAMINÉRGICA**". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Emílio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.<sup>a</sup> Dra. Ingrid Dalira Schweigert Perry (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h00 (quinze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês da Rosa, Coordenadora do Programa. Criciúma, 14 de dezembro de 2017 (dois mil e dezessete).

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês da Rosa  
Coordenadora PPGCS

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês Rosa  
Coordenadora do PPGCS

*Diana Ghisi Daniel*  
Auxiliar Administrativo PPGCS

  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



## **FOLHA INFORMATIVA**

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

Este trabalho foi realizado nas instalações de Neurociências e Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



*“Dedico essa dissertação de  
mestrado aos meus pais,  
João Carlos e Inêz pela  
confiança e apoio em todos  
os meus sonhos. ”*





## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus por ter me dado a vida, e a cada dia ser meu refúgio para quem eu pude buscar forças para enfrentar os desafios. Obrigada Senhor!

Agradeço aos meus pais Inêz Menegas Pereira e João Carlos Pereira que além de me darem a vida, sempre estiveram ao meu lado e sonharam meus sonhos comigo, nunca mediram esforços para que eu conquistasse meus objetivos e especialmente durante o Mestrado não me deixaram desistir. Obrigada por tudo. Eu amo vocês.

Agradeço a minha irmã Sara Menegas Pereira Gonçalves e esposo João Henrique Peres Gonçalves, pelas caronas, pelos conselhos, pelo amor e por toda a torcida pelos meus sonhos. Ao meu sobrinho Leonardo Pereira Gonçalves que mesmo tão pequeno, e com seus abraços e beijinhos babados que me relaxaram nesses dias de tensão. Amo vocês.

Agradeço a minha orientadora maravilhosa, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Samira da Silva Valvassori, que de fato, se transformou em uma grande amiga de todas as horas. Obrigada por ter acreditado na minha capacidade, se hoje cheguei até aqui foi porque você confiou em mim. Muito Obrigada!

Agradeço as pessoas incríveis que conheci no neurotox, Kerolen Trajano, Roger Bitencourt Varela, Wilson Resende, Gustavo Colombo Dal-Pont, Daniela Vicente Bavaresco., Samira Leila Baldin, Savana Alfredo, e enfim todos que fazem parte dessa grande família. E em especial a Fernanda Gava que dividiu um pouco do seu conhecimento, suas risadas e sua amizade comigo. Obrigada seus lindos!

Agradeço aos colegas de aula que fui conhecendo a cada disciplina cursada e que em meio as aulas tivemos a oportunidade de dividir conhecimento, experiências, comidas, retratos e risadas



sempre. Em especial Maria Cecília Manenti Alexandre e Louyse Damázio que fizeram esse último ano de mestrado ser muito mais leve. Obrigada amores!

Agradeço também a UNESCO, aos meus professores da graduação e pós-graduação, que dividiram suas experiências e conhecimentos a cada encontro. Obrigada a todos!

Enfim, esse foi um ano incrível, desafiador e cheios de altos e baixos.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado desde o início, aos que chegaram depois mas estiveram nos momentos mais difíceis, todos os meus amigos, aos que sabem que são amigos, os de perto ou que não estão tão perto assim, meu muito obrigada por sempre me apoiarem e torcerem por mim!

Obrigada a todos vocês!



*Importante não é ver o que  
ninguém nunca viu, mas  
sim, pensar o que ninguém  
nunca pensou sobre algo  
que todo mundo vê.*

*(Arthur Schopenhauer)*



## RESUMO

Estudos mostram que a fisiopatologia do transtorno bipolar está relacionada com o estresse oxidativo. O Resveratrol é um composto fenólico não flavonóide com propriedades antioxidantes e tem sido estudado no tratamento de transtornos mentais. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do resveratrol sobre o comportamento do tipo maníaco e parâmetros de dano oxidativo no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por metanfetamina (m-AMPHs). No presente estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos - com aproximadamente 60 dias de idade. Foram utilizados dois protocolos experimentais: reversão e prevenção. No tratamento de reversão, os animais foram submetidos à administração intraperitoneal (i.p) de m-AMPHs (1 mg/kg) ou salina (Sal) durante 14 dias. Entre o 8º e o 14º dia, os ratos foram tratados por gavagem 1 vez ao dia com resveratrol (15 mg/kg,) ou com água. No segundo protocolo, de prevenção, os animais foram pré-tratados com resveratrol ou água e entre o 8º e 14º dia os animais receberam m-AMPHs ou Sal. A atividade locomotora dos animais em ambos os protocolos foi avaliada 2 horas após a última aplicação de m-AMPHs, através da tarefa do campo aberto. Além disso foram avaliados parâmetros de dano oxidativo a lipídios e a proteínas no córtex frontal, hipocampo e estriado, através da quantificação dos níveis de malondealdeído, de 4-hidroxinonal e de carbonilação de proteínas. Foi avaliado também nitração de proteína, através da quantificação de 3-nitrotirosina, nas mesmas estruturas cerebrais citadas anteriormente. A m-AMPHs aumentou a locomoção e a exploração dos animais, considerados comportamentos do tipo maníaco. A administração de resveratrol não reverteu nem preveniu o comportamento do tipo maníaco induzido pela m-AMPHs. Além disso, a m-AMPHs induziu dano oxidativo aos lipídios e a proteínas no córtex frontal, hipocampo e estriado. A m-AMPHs também aumentou os níveis de 3-nitrotirosina em todas as estruturas cerebrais avaliadas. A administração de resveratrol reverteu e preveniu os danos aos lipídios e a proteínas induzidas por m-AMPHs no cérebro dos animais submetidos ao





modelo de mania em ambos os protocolos experimentais. Considerando as propriedades antioxidantes do resveratrol, talvez a suplementação com essa substância seja um possível tratamento adjunto com os estabilizadores do humor que já são usados na clínica médica. Entretanto, mais estudos são necessários para afirmar que a suplementação de resveratrol em pacientes bipolares pode ser efetiva nesse transtorno.

**Palavras chaves:** Anfetamina; Estresse Oxidativo; Resveratrol; Transtorno Bipolar;



## ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that bipolar disorder (BD) is related to the oxidative stress. Resveratrol is a non-flavonoid phenolic compound with antioxidant properties and has been studied for treatment of mental disorders. Therefore, the aim of present study is evaluated the effects of resveratrol on manic-like behaviors and proteins and lipids oxidative damage in the brain induced by methamphetamine (m-AMPHs) in an animal model of mania. In the present study were used Wistar rats, male, adults, 60 days old. Were used two experimental protocols: reversion and prevention. In the reversal treatment, Wistar rats were first given m-AMPHs (1mg/kg) or saline (Sal) for 14 days, and then, between days 8 and 14, rats were treated, once per day, with resveratrol (15 mg/kg) or water. In the prevention treatment, rats were pretreated for 14 days with resveratrol or water and between days 8 and 14 rats were submitted to the administration of m-AMPHs. Locomotor behavior was assessed using the open-field, 2h after last administration of m-AMPHs. Besides, the oxidative damage parameters were evaluated by quantification of malondialdehyde, 4-hydroxynonenal and protein carbonylation in the frontal cortex, hippocampus and striatum of rats. It was also evaluated the levels of protein nitration by quantification of 3-nitrotyrosine in the same brain structure cited above. The administration of m-AMPHs increased locomotion and exploration of the animals, both considered manic-like behaviors. The treatment with resveratrol did not reversed or prevented the manic-like behavior in the animals submitted to the model of mania. Besides, m-AMPHs induced oxidative damage to lipids and proteins in the frontal cortex, hippocampus and striatum of the animals. In addition, m-AMPHs increased the levels of 3-nytrotirosine in all brain structures evaluated. The administration of resveratrol reversed and prevented the lipid and protein damage induced by m-AMPHs in the brain of animals submitted to the animal model of mania, in both experimental models. Considering the antioxidant properties of resveratrol, perhaps supplementation with resveratrol is a possible adjunctive treatment with mood stabilizers that are already used in medical practice. However, further studies are needed to state that



resveratrol supplementation in bipolar patients may be effective in this disorder.

**Keywords:** Amphetamine; Oxidative Stress; Resveratrol; Bipolar Disorder;



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos isômeros tras-resveratrol e cis-resveratrol (Frémont, 2000).....	38
Figura 2: Desenho experimental do protocolo de tratamento de reversão com resveratrol do modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPHs).....	45
Figura 3: Desenho experimental do protocolo de tratamento de prevenção com resveratrol em um modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPHs).....	46
Figura 4: Efeitos do resveratrol sobre atividade locomotora no teste de campo aberto onde foi avaliado número de cruzamentos e levantamentos de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão e de prevenção. ....	50
Figura 5: Efeitos do resveratrol sobre os níveis de TBARS no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão e de prevenção .....	51
Figura 6: Efeitos do resveratrol sobre os níveis de 4-HNE no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão e de prevenção. ....	52
Figura 7: Efeitos do resveratrol sobre os níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão e de prevenção.....	53
Figura 8: Efeitos do resveratrol sobre os níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão e de prevenção.....	54





## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATP - Adenosina Trifosfato (do Inglês *Adenosine Triphosphate*)  
AMPH - Anfetamina (do Inglês *Amphetamine*)  
ANOVA – Análise De Variância Simples (do Inglês *Analysis Of Variance*)  
AVC - Acidente Vascular Cerebral  
BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês Brain-derived neurotrophic fator)  
CAT - Catalase  
d-AMPH - Dextroanfetamina  
DSM-V: Manual Diagnóstico E Estatístico De Transtornos Mentais V (do Inglês *Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders*)  
DA - Dopamina (do Inglês *Dopamine*)  
ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica  
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio  
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio  
eNOS - Oxido Nítrico Sintase Endotelial  
GPx - Glutathione Peroxidase  
GR - Glutathione Redutase  
GSH - Glutathione Reduzida Dissulfeto.  
GSSG - Glutathione Dissulfeto  
GST - Glutathione S-Transferase  
iNOS - Óxido Nítrico-Sintase Induzida  
IP - Injeção Intraperitoneal  
Li - Lítio (Do Inglês *Lithium*)  
LPH - Hidroperóxidos de Lipídeo  
LPS - Lipopolissacarídeos  
m-AMPHs - Metanfetamina (do Inglês *Methamphetamine*)  
MDA – Malondialdeído  
Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase - Sódio/Potássio De Adenosina Trifosfatase  
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (do Inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)  
NF-κB - Fator Nuclear kappa B  
NO – Óxido Nítrico  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PolyQ – Poliglutamina



SIRT1- Sirtuína 1

SIRT3- Sirtuína 3

SOD - Superóxido Dismutase

TB - Transtorno Bipolar

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

VPA – Valproato

4-HNE - 4-Hidroxinonenal

8-ISO - 8-Isoprostano



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR.....	31
<b>1.1.1 Definição e epidemiologia do Transtorno Bipolar</b> .....	<b>31</b>
<b>1.1.2 O estresse oxidativo no TB</b> .....	<b>32</b>
<b>1.1.3 Terapia farmacológica no TB</b> .....	<b>36</b>
1.2 RESVERATROL .....	37
1.3 MODELOS ANIMAIS DE MANIA NO TB .....	39
1.4 JUSTIFICATIVA .....	41
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>43</b>
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	44
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL .....	44
<b>3.2.1 Protocolo experimental de reversão</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2.2 Protocolo experimental de prevenção</b> .....	<b>45</b>
3.3 TESTE COMPORTAMENTAL .....	46
<b>3.3.1Atividade locomotora</b> .....	<b>46</b>
3.4 ANÁLISES MOLECULARES .....	47
<b>3.4.1 Avaliação de dano oxidativo</b> .....	<b>47</b>
3.4.1.1 Peroxidação lipídica .....	47
3.4.1.2 Oxidação e nitração proteica .....	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>82</b>
ANEXO A .....	83



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

### 1.1.1 Definição e epidemiologia do Transtorno Bipolar

O transtorno bipolar (TB) é uma condição de saúde mental crônica, altamente incapacitante, complexa e comum, considerando que é o terceiro transtorno psiquiátrico com maior impacto na qualidade de vida dos pacientes. Acomete cerca de 1,5% da população mundial, e causa alterações no comportamento social e problemas médicos, no Brasil a prevalência geral é de 2,1% da população, porém esses números podem ser ainda maiores, uma vez que muitos casos podem ser confundidos com outros transtornos psiquiátricos (Kendall et al., 2014; Magalhães et al.; 2016; Merikangas et al., 2007; Subramaniam et al., 2013). No TB são comuns as tentativas e o suicídio consumado, lembrando que a causa mais frequente de mortalidade no TB é o suicídio, onde o risco para a ocorrência de é aproximadamente de 20 a 30 vezes maior em pessoas acometidas com esse transtorno quando comparado com a população em geral (Eroglu et al., 2013; Weissman et al., 1999). O TB é considerado responsável por um quarto das mortes por suicídio, (American Psychiatric Association, 2013; Bega et al., 2012; Pompili et al., 2013), e normalmente a ideação e a tentativa de suicídio ocorrem durante a fase depressiva do transtorno (Novick et al., 2010).

A caracterização do TB é feita a partir da presença de episódios recorrentes de mania e de depressão. Onde a presença de episódio maníaco/hipomaníaco é o marco no diagnóstico do TB (Kendall et al., 2014). Nesse transtorno o termo bipolar expressa os dois polos de humor apresentados pelo paciente. Atualmente o TB é dividido em Tipo I, II, Ciclotímico e Transtornos Relacionados, que diferem entre si pela gravidade, duração e intensidade dos episódios (American Psychiatric Association, 2013).

Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM V – Sigla em inglês), atualizado em 2013, para ser diagnosticado como um episódio maníaco clássico é necessário a presença de, no mínimo, cinco dos seguintes sintomas período de pelo menos 7 dias: estado de humor elevado, podendo isso significar uma alegria contagiante ou uma irritação agressiva, autoestima inflada ou



grandiosidade, redução da necessidade do sono, fuga de ideias, distrabilidade, agitação psicomotora, aumento da atividade sexual e comportamento de risco. A mania e a hipomania são semelhantes, porém diferem na sua gravidade, duração e número de sintomas, sendo a mania a mais intensa. Já um episódio depressivo é caracterizado pela presença de, no mínimo, cinco dos seguintes sintomas por um período maior do que 15 dias: humor deprimido, perda de interesse ou prazer pelas atividades comuns (anedonia), perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, retardo psicomotor, fadiga, perda de energia, diminuição da concentração, indecisão e os pensamentos costumam ser negativos, sempre em torno de morte e/ou doença e/ou suicídio (American Psychiatric Association, 2013).

Segundo os critérios para formulação do diagnóstico do TB, esta variação do humor deve afetar de maneira significativa as atividades sociais e profissionais do indivíduo e apresentar duração de pelo menos uma semana, ou menos de uma semana, caso a hospitalização tenha ocorrido (Organização Mundial de Saúde, OMS, 1994). O diagnóstico do TB ainda é realizado exclusivamente pela avaliação dos sintomas, e apesar do grande avanço, ainda não existe nenhum marcador biológico para o transtorno (Kapczinski, et al 2004;). Apesar dos crescentes avanços para o entendimento da neurobiologia do TB, sua exata fisiopatologia permanece desconhecida evidenciando a necessidade de mais estudos (Grande et al., 2016; Rosenblat, McIntyre, 2016).

### **1.1.2 O estresse oxidativo no TB**

Nos últimos anos vem crescendo o número de estudos clínicos e pré-clínicos que tem relacionado o mecanismo do estresse oxidativo na patogênese das doenças psiquiátricas, tais como o TB (Andreazza et al., 2009; Berk et al., 2011; Frey et al., 2006; Halliwell, 2006; Jornada et al., 2011; Manzanero et al., 2013). Segundo Kato (2007), existem evidências que a disfunção mitocondrial, que resulta em prejuízo no metabolismo energético celular, seria o principal desencadeador desse sistema, considerando que um estado energético celular anormal pode levar à perda da função e da plasticidade neuronal e, conseqüentemente, a alterações cognitivas e comportamentais, que são características do TB (Steckert et al., 2010).

As mitocôndrias são organelas intracelulares, cuja função principal é a produção de adenosina trifosfato (ATP), através da

fosforilação oxidativa. Os neurônios apresentam membrana excitável, que consome energia para manter o equilíbrio intracelular de íons contra o gradiente de concentração, através dos canais de íons, sendo que os processos via sódio/potássio de adenosina trifosfatase ( $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ ) e ATPase de Cálcio situadas na membrana são os que mais usam energia em células excitáveis (Nicholls, Budd, 2000).

Embora a fosforilação oxidativa seja fundamental para o metabolismo, devido a formação de ATP, ela produz também espécies reativas de oxigênio (ERO), especialmente nos complexos I e III (Green et al., 2004). Entre as ERO 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 ( $\cdot\text{OH}$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Yu, 1994).

Algumas das ERO são radicais livres, enquanto outras são agentes oxidantes não radicalares, como por exemplo, o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto que  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\cdot\text{OH}$  são classificados como radicais livres de oxigênio porque apresentam um elétron desemparelhado em sua estrutura atômica. Os radicais livres, por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, são as espécies mais reativas (Halliwell e Gutteridge, 1989). O  $\cdot\text{OH}$  é a ERO mais potente e, conseqüentemente, é o que causa maior dano nos sistemas biológicos, devido ao seu tempo de vida extremamente curto ( $1 \times 10^{-9}$ s) e de sua alta reatividade com uma grande variedade de moléculas orgânicas (Yu, 1994). Além de ser produzido durante a fosforilação oxidativa, o radical  $\cdot\text{OH}$  pode, ainda, ser formado por duas diferentes vias alternativas em organismos vivos, pela reação de Fenton e pela reação de Haber-Weiss (Haber e Weiss, 1934; Halliwell e Gutteridge, 1990).

Para que haja um equilíbrio na concentração de ERO no organismo existe um sistema de proteção antioxidante que pode ser enzimático ou não enzimático, e ambos trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das ERO nos tecidos. Porém em situações em que a produção de ERO excede a capacidade de conservação antioxidante, ocorre uma condição chamada de estresse oxidativo, que deixa as biomoléculas mais vulneráveis a danos, podendo induzir a célula a apoptose (Cochrane, 1991; Imai e Nakagawa, 2003). Dessa forma, quando incontrolável, o estresse oxidativo provoca apoptose também em neurônios (Manzanero et al., 2013).

O cérebro é particularmente vulnerável a produção de ERO, pois metaboliza 20% do oxigênio total do corpo e, os primeiros estudos tem

demonstrado suscetibilidade à peroxidação das membranas do cérebro (Steckert et al., 2010).

No sistema antioxidante enzimático está incluído a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx), a glutatona redutase (GR) e a glutatona S-transferase (GST) (Chance et al., 1979; Yu, 1994). Onde a SOD converte  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , o qual é em seguida reduzido a  $H_2O$  pela CAT. A GPx também converte  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , oxidando a glutatona reduzida (GSH) ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). A GSH é regenerada pela GR por intermédio da oxidação de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH sigla em inglês) (Imai e Nakagawa, 2003).

Além das ERO, existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que tem como principais representantes o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (Bowler e Crapo, 2002). A interação do  $NO^{\cdot}$  com o  $O_2^{\cdot-}$  produz o  $ONOO^{\cdot}$ , que é capaz de se decompor produzindo potentes oxidantes em pH fisiológico. Os  $NO^{\cdot}$  e  $ONOO^{\cdot}$  não possuem uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações controladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos e, em especial, pelas concentrações de  $O_2^{\cdot-}$  disponíveis (Kooy et al., 1997; Rao et al., 199).

Algumas pesquisas estão sendo realizadas com objetivo de identificar se alguns marcadores de estresse oxidativo influenciam no sistema nos transtornos psiquiátricos, como por exemplo: quantificação de hidroperóxidos de lipídeo (LPH), níveis de malondialdeído (MDA), de 4-hidroxinonal (4-HNE), de 8-Isoprostano (8-ISO), de proteínas carboniladas e de 3-nitrotirosina (Andreazza et al., 2009; 2013; Gubert et al., 2013). Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, estão os gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o MDA e o 4-HNE. O dano a proteínas também pode ocorrer pelo ataque direto de ERO à sua estrutura, ou através de moléculas originadas de processos de oxidação, como por exemplo, o MDA e 4-HNE (Halliwell e Gutteridge, 2007). Dentre os isoprostanos, o 8-ISO é um composto do tipo prostaglandina, da família  $F_2$ -isoprostanos, produzido pela peroxidação lipídica, que resulta a partir da oxidação do ácido araquidônico (Moore e Roberts, 1998).

Existe também o dano oxidativo das proteínas, que ocorre em função da nitração da tirosina induzida por  $ONOO^{\cdot}$ , formando assim 3-nitrotirosina (Beckman e Koppenol 1996; Naoi et al., 2005). As lesões causadas pela nitração da tirosina são menos agressivas quando

comparados com os danos provocados pela carbonilação de proteínas (Irie et al., 2003; Osoata et al., 2009). A formação de carbonilas representa um marcador precoce da oxidação de proteínas. Essa ação envolve cátions do ciclo redox como o ferro e o cobre, que por possuírem locais de ligação a proteínas e associados a  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  conseguem transformar resíduos de aminoácidos em carbonilas. Os aminoácidos lisina, arginina, prolina e histidina são os mais propensos a gerar carbonilas (Descamps-Latscha e Witko-Sarsat, 2001; Descamps-Latscha et al., 2001).

Alguns estudos estão sendo desenvolvidos relacionando TB e ERO, através da técnica de TBARS, níveis elevados de peroxidação lipídica, dano a proteínas, e formação de grupamento de proteínas carbonilas tem sido observados no sangue de pacientes com TB, em comparação com controles saudáveis (Andreazza et al., 2009; Kapczinski et al., 2011; Pedrini et al., 2012). Associado a esses dados estudos *post-mortem* tem confirmado que no córtex pré-frontal de pacientes bipolares foram encontrados níveis elevados de grupamentos carbonila, 3-nitrotirosina, 4-HNE e 8-ISO (Wang et al., 2009; Andreazza et al., 2010; 2013). Andreazza e colegas (2009) observaram um aumento de glutathione, tanto de GST quanto de GR, no sangue de pacientes em estágios iniciais do TB. Ao mesmo tempo que o sistema de defesa antioxidante aparenta estar alterado no TB, mesmo em estágios iniciais do transtorno, foram observados níveis maiores da enzima antioxidante SOD no sangue de pacientes bipolares, durante episódios de mania e de depressão (Kunz et al., 2008).

Existem também evidências do envolvimento dos fatores neurotróficos com o estresse oxidativo, estudos tem demonstrado que o estresse oxidativo está aumentado em situações em que o fator neurotrófico derivado do cérebro (sigla do inglês - BDNF) está diminuído em pacientes bipolares (Kapczinski et al, 2008a; b), indicando uma associação entre o BDNF e o estresse oxidativo no TB. Além disso, os avanços dos métodos de pesquisa em psiquiatria biológica, através de estudos pré-clínicos, e do atual conhecimento sobre os mecanismos de ação dos estabilizadores de humor, Lítio (Li) e Valproato (VPA), observaram que esses estabilizadores são capazes de aumentar os níveis de BDNF e proteger o cérebro de roedores contra danos oxidativos (Jornada et al, 2010; 2011).

Há evidências que o TB é uma doença multifatorial decorrente de combinações de diferentes perfis genéticos, distinta pela presença de

genes protetores em relação aos genes de predisposição, mas que sofre influências ambientais, incluindo estressores crônicos, experiências traumáticas e alimentação. Sendo que a alimentação é um fator que pode ser alterado (McNamara, 2014; Martinowich, 2009).

### **1.1.3 Terapia farmacológica no TB**

O TB é um distúrbio complexo e possui uma variabilidade de características clínicas, sendo assim, não existe um tratamento único que seja eficaz em todos os pacientes (Moreno et al., 2004). O Li é há 70 anos o único fármaco estabilizador de humor no mercado, pois tem bom efeito sobre os episódios maníacos e apresenta um efeito moderado sobre a fase da depressão (Geddes et al., 2004). Além disso, reduz tanto a mortalidade pelo suicídio quanto a mortalidade por outras comorbidades (Cipriani et al., 2005; Ohgami et al., 2009; Tondo e Baldessarini, 2009).

As vias responsáveis pela resposta no TB ao Li não estão totalmente descritas na literatura, porém muitos estudos estão em andamento com esse objetivo (Chiu e Chuang, 2010). O tratamento para o TB com Li continua sendo a opção de tratamento mais eficaz, e melhor tolerada por muitos pacientes, porém nos últimos anos houve uma mudança considerável com a introdução de novos fármacos como o VPA, a carbamazepina (CBZ) e outros anticonvulsivantes e antipsicóticos, no entanto nem os pacientes aderem a esses fármacos isoladamente fazendo com que o tratamento seja feito com polifarmacácia (Lloyd et al., 2003; Young, 2007).

Os estabilizadores do humor, principalmente o Li, tem demonstrado efeitos neuroprotetores, possivelmente através das vias que regulam a plasticidade celular, a regeneração de axônios em modelos animais e celulares e a promoção da neurogênese, incluindo as vias ligadas a sinalização de neurotrofinas (Quiroz et al., 2008; Zarate et al., 2006), reacendendo o interesse nesta droga para o tratamento de uma grande variedade de distúrbios cerebrais e neurológicos (Chiu e Chuang, 2010; Machado-Vieira et al., 2009).

Através destes mecanismos, demonstraram-se doses terapêuticas de Li para defender as células neuronais contra diversas formas de insultos mortais e para melhorar os défices comportamentais e cognitivos em vários modelos animais de doenças neurodegenerativas, incluindo TB, acidente vascular cerebral (AVC), esclerose lateral

amiotrófica (ELA), síndrome X frágil, bem como as doenças de Huntington, Alzheimer e Parkinson (Chiu e Chuang, 2010).

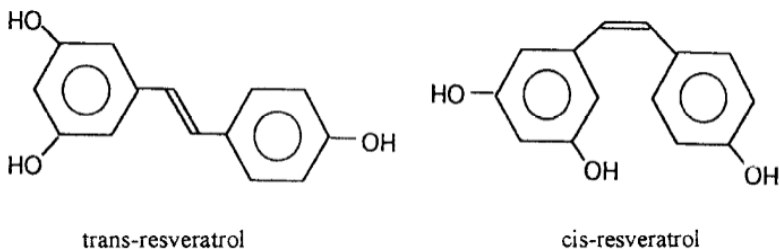
Contudo, o perfil de segurança clínica dos estabilizadores do humor é delicado, pois, estes fármacos têm apresentado efeitos adversos, o que estimula os pacientes a interromperem a continuidade do tratamento (Young, 2007; Mcknight, 2012). Os efeitos colaterais podem incluir ganho de peso, nefrotoxicidade, náuseas, tremor, diminuição do impulso ou do desempenho sexual, ansiedade, queda de cabelo, problemas do movimento e/ou boca seca (Vacheron-Trystram, 2004). Levando em consideração que pacientes bipolares possuem danos graves que são acentuados a cada episódio do humor, a escolha da farmacoterapia para o tratamento da depressão bipolar não depende somente do conhecimento sobre a eficácia do medicamento, mas também dos riscos associados (Ghaemi, et al., 2001).

Além dos fármacos acima citados, utilizados principalmente no tratamento da fase maníaca, há de se ressaltar os fármacos utilizados durante a fase da depressão bipolar. O tratamento desta fase é um desafio na prática clínica, pois o uso de antidepressivos possui um risco muito grande no desencadeamento de um novo episódio maníaco. Os antidepressivos mais usados para tratar a depressão em pacientes bipolares são os inibidores da recaptção de serotonina e a bupropiona – um inibidor da recaptção de dopamina (Sachs et al., 2000). Embora estes fármacos tenham mostrado sua eficácia no tratamento da depressão unipolar, não existem estudos que forneçam suporte para guiar a prática clínica sobre o uso de antidepressivos no TB (Ghaemi, et al., 2001; Sachs et al., 2007).

Apesar do grande avanço o tratamento do TB com Li, anticonvulsivantes, antipsicóticos atípicos e antidepressivos, muitos pacientes não toleram ou respondem adequadamente a esses fármacos, e para um grande número de pacientes, a farmacoterapia existente não é eficaz (Zarate et al., 2006; Keck, 2003). Além disso, há mais de 70 anos, desde a identificação dos efeitos antimaníacos de Li, não foram desenvolvidos outros fármacos específicos para o tratamento do TB, que tenham uma ação precisa em ambos os polos do humor, exigindo novas abordagens terapêuticas.

## 1.2 RESVERATROL

O resveratrol (3,4, 5-trihidroxiestilbeno) é um composto fenólico não flavonoide (Bonaga et al., 1990), pertencente ao grupo dos estilbenos, sendo considerado um derivado fenólico de grande importância (Flanzy, 2000). É um polifenol biologicamente potente, que tem amplos efeitos sobre diversos processos biológicos nas células (Markus; Morris 2008). O resveratrol é encontrado na natureza na forma isomérica *cis* e *trans*, conforme figura 1, a forma *trans* foi observada em uvas e outras fontes alimentares em uma quantidade muito maior do que a *cis*. Além disso, a forma *cis* não é encontrada disponível comercialmente (Orallo, 2006; Frémont, 2000).



**Figura 1** - Estrutura química dos isômeros *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol (Frémont, 2000).

Em uma revisão de literatura foram comparados os efeitos antioxidantes dos dois isômeros de resveratrol em diferentes modelos experimentais (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*). Os autores observaram que o *trans*-resveratrol apresentou efeitos antioxidantes semelhantes em seres humanos e em animais. Pode-se perceber também que esse composto apresentou uma série de atividades biológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (Orallo, 2006).

A suplementação de resveratrol tem ações em regiões específicas do cérebro, como a área medial do córtex e do corpo do estriado. Estudos *in vitro* e em modelos animais demonstraram que esse polifenol possui uma ação pleiotrópica, proporcionando proteção contra a inflamação, estresse oxidativo e câncer (Baur e Sinclair, 2006; Cottart et al., 2014). Sua ação no papel da via sirtuína 1 (SIRT1) na biogênese mitocondrial, juntamente com os efeitos sobre a sensibilidade à insulina e a melhora na função motora, revela ações neuroprotetoras.

No entanto, os exatos mecanismos de ação, como seus efeitos antioxidantes, não são completamente compreendidos. Acredita-se que

possa possuir propriedades diretas ou induzir enzimas anti-oxidantes endógenas, com uma ação indireta (Bastionetto et al., 2015). Sabe-se que a enzima antioxidante, superóxido dismutase manganês (SOD2), é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo gerado nas mitocôndrias e a sirtuína 3(SIRT3), um membro da classe III histona deacetilase, que se encontra principalmente nas mitocôndrias, pode regular muitos aspectos do metabolismo oxidativo (Geralt e Villarrouy., 2012). Sendo assim, estudos demonstraram que a SIRT3 é um importante regulador mitocondrial em resposta ao estresse, pela ativação de SOD2 (Chen et al.,2011; Tao et al., 2010).

No contexto dos seus efeitos protetores contra danos oxidativos, a principal capacidade do resveratrol é regular a expressão de vários radicais livres, assim como a indução da expressão de SOD2 em vários órgãos, incluindo o cérebro de roedores e em várias linhas de células, incluindo células neuronais. Recentes estudos focaram nos efeitos neuroprotetores do resveratrol, demonstrando que este composto protege contra a lesão isquêmica cerebral e impede déficits de memória contra danos oxidativos (Orsu et al., 2013; Schmatz et al., 2009; Sadi e Konat., 2015; Fukui et al., 2010a;2010b;2010c). O resveratrol tem sido indicado como uma opção para o tratamento de doenças cardiovasculares e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, tanto *in natura* quanto a utilização de sua estrutura química no desenvolvimento de novos fármacos (Orallo, 2006).

No cérebro, essa substância tem-se mostrado protetora em uma ampla gama de patologias neurológicas (Singh, 2013) incluindo a doença de Parkinson (Blanchet et al., 2008; Khan et al. 2010), isquemia cerebral (Della-Morte et al., 2009), a neuropatia diabética (Kumar et al., 2013) da doença de Huntington, (Anekonda, 2006) e Alzheimer (Chen et al, 2005) entre outros. A qualidade da alimentação vem sendo reconhecida como um fator potencial capaz de afetar a estabilidade do humor, a cognição, a modulação da estrutura cerebral e a conectividade funcional, além de influenciar tanto a taxa quanto o grau de progressão das alterações relacionadas ao envelhecimento, ao cérebro e ao comportamento (Beyer e Payne, 2016; Huhn et al. 2015; Gustafson et al., 2015).

### 1.3 MODELOS ANIMAIS DE MANIA NO TB

Um modelo animal em transtornos psiquiátricos, para ser válido,



deve ser hábil para reproduzir aspectos fisiopatológicos da condição humana, mimetizar sintomas da doença como comportamentos equivalentes aos encontrados na doença, e demonstrar reversão ou prevenção de tais sintomas através de alternativas terapêuticas consolidadas que melhorem os sintomas observados em humanos (Ellenbroek e Cools, 1990; Machado Vieira et al., 2004). Os modelos animais devem ser classificados de acordo com a forma como acontece a indução da doença, podendo ser farmacológico, ambiental, genético ou cirúrgico (Valvassori, 2016).

O TB se apresenta como um transtorno complexo, alternando sua evolução clínica com mudanças de humor incluindo episódios maníacos e depressivos, fazendo com o desenvolvimento de um modelo animal adequado seja um desafio. Atualmente, não há nenhum modelo animal com características fiéis para ser considerado um modelo fidedigno de TB (Machado-Vieira et al., 2004).

O marco clínico do diagnóstico do TB é o comportamento maníaco; portanto, um modelo animal adequado do TB deve mimetizar sintomas de mania, como por exemplo: hiperatividade, comportamentos estereotípicos e/ou agressividade (Krishnan, 2008).

No presente estudo foi utilizada, como modelo de mania, a administração de Metanfetamina (m-AMPH) em ratos Wistar. Prévios estudos demonstram que a administração de anfetaminas (AMPHs), de uma forma geral, mimetiza comportamentos do tipo maníacos, como: hiperatividade, comportamentos de risco e de agressividade em ratos Wistar (da-Rosa et al., 2012b). Além disso, as regiões do cérebro envolvidas no comportamento do tipo maníacos em ratos Wistar, principalmente, o hipocampo e o córtex pré-frontal, também têm sido implicados na fisiopatologia do transtorno bipolar (Valvassori et al., 2013). Sendo, assim, Wistar é a espécie de roedores mais utilizada e mais indicada para estudos nessa área.

As AMPHs são estimulantes do sistema nervoso central (SNC) que agem aumentando o fluxo de dopamina (DA), inibindo a recaptção de DA e a monoamina oxidase - enzima responsável pela quebra das monoaminas (da-Rosa et al., 2012b). Estudos realizados com ratos, os quais foram submetidos à administração de AMPHs, demonstraram que a ação desta substância induz a hiperlocomoção, alterações das fases do sono e comportamento de risco nestes animais, sintomas que se assemelham a comportamentos típicos de mania (Frey et al., 2006a; Einat 2007; Nestler e Hyman, 2010).

Além destes sintomas, outro estudo pré-clínico demonstrou que a administração crônica de AMPHs induz estresse oxidativo no cérebro de ratos (Frey et al., 2006a). Além de alterações comportamentais que foram induzidas através da utilização da AMPHs em ratos, a droga também causou modificações bioquímicas no cérebro destes animais, condizentes com o aumento da peroxidação lipídica (Frey et al., 2006b), compatível ao que foi observado em pacientes com TB. Deste modo, todos estes achados sugerem que a administração de AMPHs em ratos induz um estado comportamental e bioquímico semelhante às crises de mania observadas em pacientes que sofrem de TB.

Um estudo realizado por da-Rosa e colaboradores (2012b) comparou m-AMPH e dextro-anfetamina (d-AMPH) quanto a potência sobre o comportamento e o dano oxidativo no cérebro de ratos. Os resultados deste estudo demonstraram que d-AMPH e m-AMPH têm efeitos comportamentais equivalentes, porém os autores demonstraram que doses mais baixas de m-AMPH (1, 0,5 e 0,25 mg/kg) são potencialmente equivalentes a uma alta doses de d-AMPH 2 mg/kg (da-Rosa et al, 2012b). Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram também que os danos a proteína induzida por m-AMPH e o dano lipídico foram superiores aos induzidos por d-AMPH em todas as estruturas cerebrais avaliadas, pré-frontal, amígdala e estriado. Porém, todas as duas formas de anfetamina induzem efeitos comportamentais do tipo maníaco e dano oxidativo a biomoléculas cerebrais, mimetizando sintomas e a neurobiologia do TB.

Estudos prévios de nosso laboratório caracterizaram bem o modelo animal de mania induzido pela administração da AMPHs, onde os estabilizadores do humor, Li e Valproato, reverteram e preveniram a hiperatividade induzida por esse psicoestimulante (Frey et al., 2006a, b).

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Embora o TB seja um transtorno que afeta a vida de milhares de pessoas, não houve muita evolução no seu tratamento desde que foi diagnosticado pela primeira vez, principalmente pela falta de conhecimento sobre a fisiopatologia da doença. Há alguns anos estão sendo intensificadas as pesquisas que buscam desenvolver medicamentos mais eficazes, porém ainda são necessários mais estudos nessa área.

Em meio a essa busca por alternativas farmacoterápicas, existe uma grande procura pelo desenvolvimento de novos estabilizadores do humor que além do controle dos sintomas também tenha como potencial terapêutico a proteção neuronal (Ribeiro et. al., 2005).

Tendo em vista a atual dificuldade no tratamento do TB, visto que a maioria dos medicamentos visa apenas tratar os sintomas do transtorno, e a necessidade de pesquisas na busca de novos fármacos, o presente estudo se fez importante por investigar processos de potencial terapêutico do resveratrol para o tratamento e para a prevenção de mania e dano cerebral decorrente do estresse oxidativo em um modelo animal induzido por AMPHs.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do resveratrol sobre o comportamento do tipo maníaco e parâmetros de dano oxidativo no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar os efeitos do tratamento com resveratrol sobre a atividade locomotora e exploratória de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs, nos modelos de reversão e prevenção;

2. Avaliar os efeitos do tratamento com resveratrol sobre os parâmetros de peroxidação lipídica (níveis de TBARS e níveis de 4-HNE) no hipocampo, córtex frontal e estriado de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por m-AMPHs, nos modelos de reversão e prevenção;

3. Avaliar os efeitos do tratamento com resveratrol sobre os parâmetros de oxidação e nitração protéica (níveis de proteínas carboniladas e de 3-nitrotirosina) no hipocampo, córtex frontal e estriado de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por m-AMPHs, nos modelos de reversão e prevenção.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

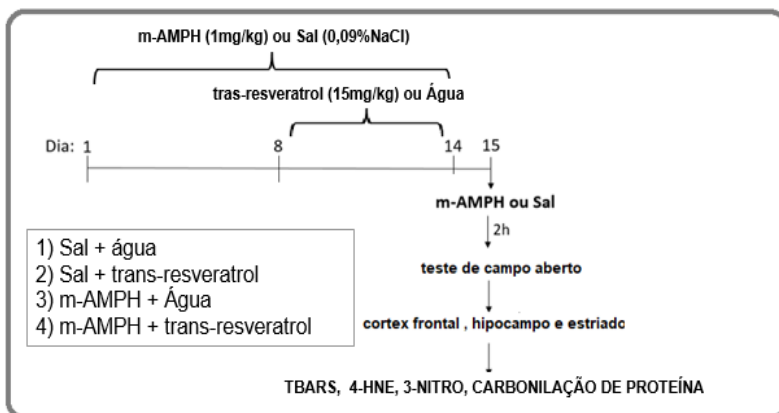
Nesse estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (250-300g) provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e comida e o ambiente mantido a temperatura de  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ .

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). O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC (CEUA-UNESC) sob o protocolo de número nº 102/2016-2 (ANEXO A).

#### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

##### 3.2.1 Protocolo experimental de reversão

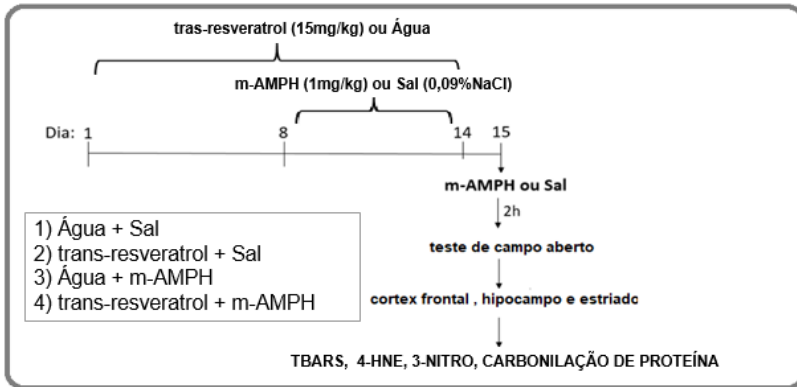
O protocolo experimental de reversão apresentou duração de 14 dias e visou mimetizar o tratamento de um episódio de mania aguda e foi primeiramente descrito por Frey e colaboradores (2006). Nesse protocolo, os animais foram submetidos a injeções i.p. diárias, durante 14 dias de m-AMPHs (1 mg/kg) ou de solução salina (Sal - 0,09% NaCl) para o grupo controle. Do oitavo ao décimo quarto dia, além das injeções de m-AMPHs, os animais foram tratados com uma administração diária por gavagem de trans-resveratrol (15 mg/kg) ou água. Os grupos experimentais do presente protocolo foram: No décimo quinto dia experimental, os animais receberam uma única injeção de m-AMPHs e duas horas após foram submetidos ao teste do campo aberto (**Figura 2**), o qual será descrito a seguir. Todas as substâncias foram administradas em um volume de 1mL/kg. A concentração de m-AMPHs, foi baseada em estudos prévios (da-Rosa et al., 2012b).



**Figura 2:** Desenho experimental do protocolo de tratamento de reversão com resveratrol do modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPHs). Os animais foram submetidos a administração de m-AMPHs ou salina (Sal) durante 14 dias e entre o 8º e o 14º dias, além da administração de m-AMPHs, os animais foram tratados com resveratrol. No 15º dia experimental, os animais receberam uma única injeção de m-AMPHs e duas horas após foram submetidos ao teste do campo aberto. Imediatamente após o teste do campo aberto os animais foram mortos por decapitação e seus cérebros foram dissecados em córtex frontal, hipocampo e estriado para posterior análises bioquímicas. As análises bioquímicas avaliadas foram: quantificação dos níveis de: malondialdeído (MDA), de 4-hidroxinonenal (4-HNE), 3-nitrotirrisina e carbonilação de proteínas. Fonte: Do autor.

### 3.2.2 Protocolo experimental de prevenção

O protocolo experimental de prevenção teve duração de 14 dias e teve por objetivo mimetizar a manutenção de um episódio de mania aguda. Nesse protocolo, os animais foram tratados, durante 14 dias, com administrações diárias de resveratrol (15 mg/kg) ou água por gavagem. Do oitavo ao décimo quarto dia, além das gavagens de resveratrol, os animais receberam injeções i.p. diárias de m-AMPHs (1mg/kg) ou solução Sal. No décimo quinto dia experimental, os animais receberam uma única injeção de m-AMPHs, e duas horas após foram submetido ao teste comportamental (**Figura 3**). A dose de m-AMPHs foi baseada em estudos prévios (da-Rosa et al., 2012b).



**Figura 3:** Desenho experimental do protocolo de tratamento de prevenção com resveratrol em um modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPHs). Os animais foram pré-tratados com resveratrol durante 14 dias e entre o 8º e o 14º dias, além da administração de resveratrol, foi administrado também nos animais m-AMPHs ou salina (Sal). No 15º dia experimental, os animais receberam uma única injeção de m-AMPHs e duas horas após foram submetidos ao teste do campo aberto. Imediatamente após o teste do campo aberto os animais foram mortos por decapitação e seus cérebros foram dissecados em córtex frontal, hipocampo e estriado para posterior análises bioquímicas. As análises bioquímicas avaliadas foram: quantificação dos níveis de: malondialdeído (MDA), de 4-hidroxinonenal (4-HNE), 3-nitrotirrisina e carbonilação de proteínas. Fonte: Do autor.

### 3.3 TESTE COMPORTAMENTAL

#### 3.3.1 Atividade locomotora

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto, que consiste em uma caixa de 40 x 60 cm cercada por três paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada, com uma parede de vidro frontal, com o assoalho dividido em nove quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante traseiro esquerdo, a fim de explorar a arena por 5min, onde foram contados os cruzamentos entre as linhas pretas (*crossing*), para a avaliação da atividade locomotora, e a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras (*rearing*), para a

avaliação da atividade exploratória. Imediatamente após o teste comportamental, os animais foram eutanasiados através de decapitação e o cérebro dissecado em córtex frontal, hipocampo e estriado. As amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, e logo após foram armazenadas a -80 °C para posterior análise bioquímica.

### 3.4 ANÁLISES MOLECULARES

#### 3.4.1 Avaliação de dano oxidativo

##### 3.4.1.1 Peroxidação lipídica

Para avaliar a peroxidação lipídica foi utilizado a avaliação nos níveis de TBARS e 4-HNE no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, seguindo orientações do fabricante ou metodologia da literatura.

Os níveis de TBARS foram medidos durante uma reação ácida aquecida, conforme previamente descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras obtidas foram misturadas com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico, fervidas por 30 minutos e após, a quantidade de TBARS foi determinada espectrofotometricamente na absorvância de 532 nm.

Os adutos proteicos de 4-HNE formados por modificações em lisina, histidina, ou cisteína foram quantificados através de um kit ELISA sanduíche (CellBiolabs, Inc., San Diego, CA, EUA ; STA - 338), utilizando um ensaio imunoenzimático, de acordo com Kimura e colegas (2005).

##### 3.4.1.2 Oxidação e nitração proteica

Antes de iniciar a dosagem das proteínas foi realizada a determinação das dosagens de proteínas totais através dos métodos de Lowry e colaboradores (1951) onde a albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada como padrão.

A carbonilação de proteínas é utilizada para avaliar o dano oxidativo em proteínas onde é determinado pelos níveis de grupos carbonila, conforme previamente descrito por Levine e colaboradores (1990). As amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). Os grupos 54 carbonila foram quantificados no espectrofotômetro na absorvância de 370 nm.



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

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

## 4 RESULTADOS

Os efeitos do resveratrol sobre o comportamento do tipo maníaco estão apresentados na **figura 4** nos modelos de reversão (**A** e **B**) e de prevenção (**C** e **D**). Como pode ser observado, a m-AMPHs aumentou a locomoção (número de cruzamentos) e a atividade exploratória dos animais (número de levantamentos), tanto no modelo de reversão (**A** e **B**) quanto no modelo de prevenção (**C** e **D**). Porém a administração de resveratrol não reverteu nem preveniu a hiperlocomoção dos animais induzida pela m-AMPHs. Entretanto, no modelo de reversão (**A** e **B**) pode ser observado o fato de que o grupo m-AMPHs+resveratrol não foi diferente estatisticamente do grupo controle (cruzamentos e levantamentos), o que pode indicar uma melhora parcial da hiperatividade induzida pela m-AMPHs. No modelo de prevenção, o mesmo pode ser observado no número de levantamentos, sendo que o grupo resveratrol+m-AMPHs também não foi diferente estatisticamente do grupo controle, podendo indicar uma prevenção parcial da hiperatividade induzida pela m-AMPHs.

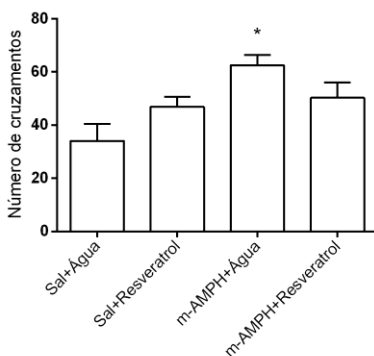
Nesse estudo também foram avaliados os efeitos do resveratrol, conforme mostra a **figura 5**, sobre os níveis de TBARS no córtex frontal, hipocampo e estriado nos modelos de reversão (**A**, **B** e **C**) e de prevenção (**D**, **E** e **F**). A administração de m-AMPHs aumentou os níveis de TBARS no cérebro dos animais, indicando dano oxidativo a lipídios cerebrais. A administração de resveratrol reverteu e preveniu essa peroxidação lipídica em todas as regiões cerebrais avaliadas.

Quanto aos níveis de 4-HNE no córtex frontal, hipocampo e estriado dos ratos a **figura 6** mostra os efeitos do resveratrol sobre nos modelos de reversão (**A**, **B** e **C**) e de prevenção (**D**, **E** e **F**). Onde a administração de m-AMPHs aumentou a quantidade de 4-HNE no córtex frontal, hipocampo e estriado dos ratos, em ambos os modelos

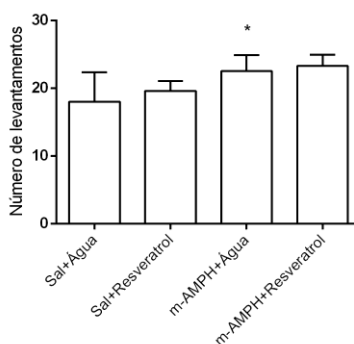
experimentais. Entretanto, a administração de resveratrol reverteu e preveniu o aumento de 4-HNE induzido por m-AMPHs em todas as estruturas cerebrais avaliadas.

A **figura 7** mostra os efeitos do resveratrol sobre os níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido pela administração de m-AMPHs, nos modelos de reversão (**A**, **B** e **C**) e prevenção (**D**, **E** e **F**). A administração de m-AMPHs aumentou os níveis de proteínas carboniladas no cérebro dos animais, indicando dano oxidativo a proteínas cerebrais. Em contra partida a administração de resveratrol reverteu e preveniu essa oxidação proteica em todas as regiões cerebrais avaliadas.

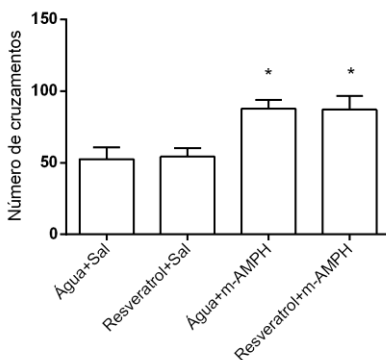
**Figura 4A**



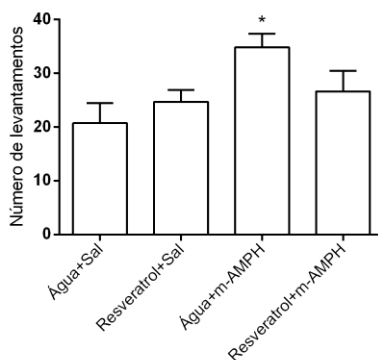
**Figura 4B**



**Figura 4C**

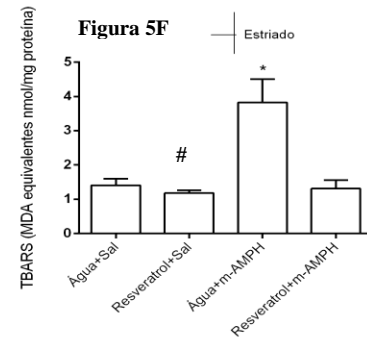
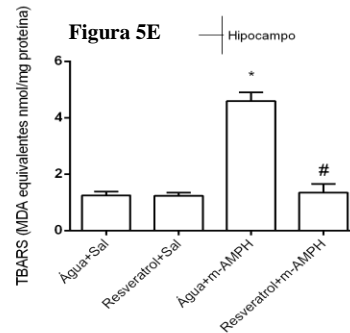
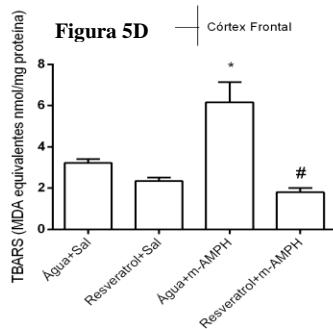
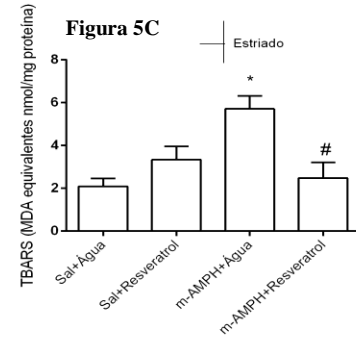
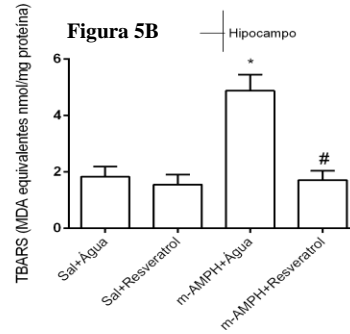
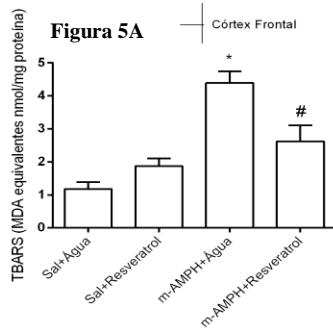


**Figura 4D**

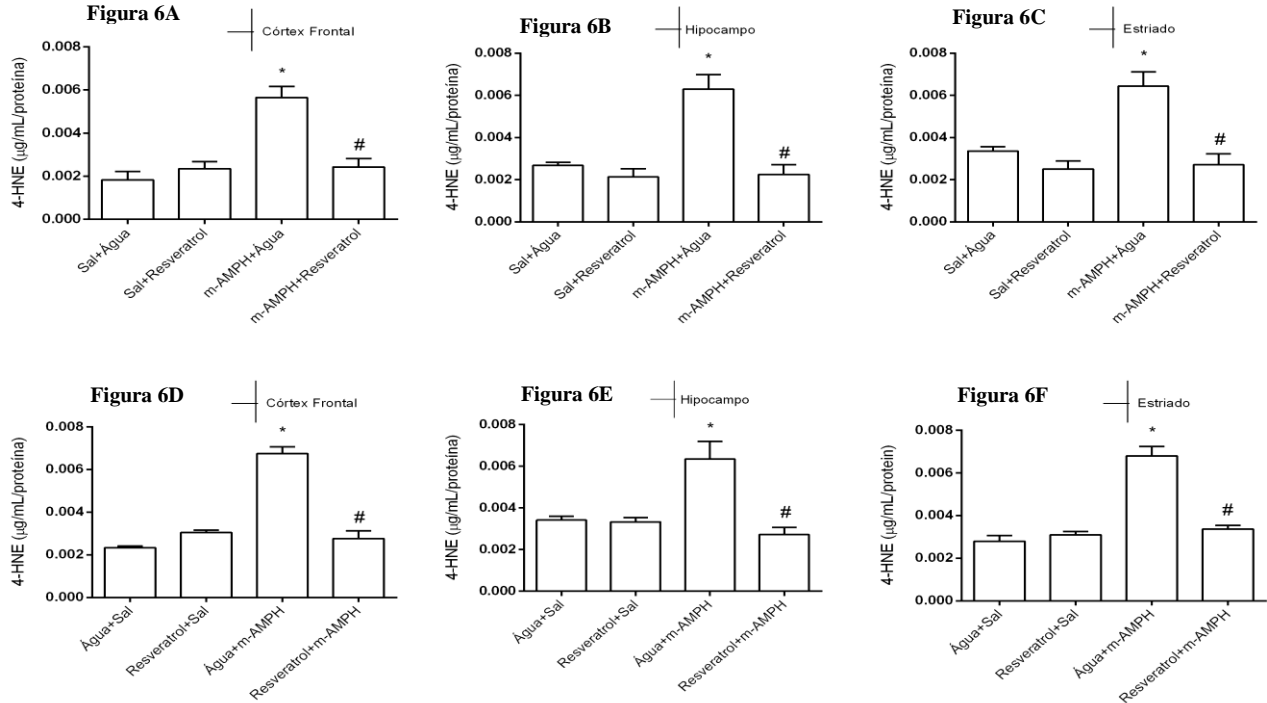


**Figura 4:** Efeitos do resveratrol sobre atividade locomotora no teste de campo aberto onde foi avaliado número de cruzamentos e levantamentos de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão (A e B) e de prevenção (C e D). As barras representam média, barras de erro representam desvio padrão; \* $p \leq 0,05$  vs. grupo Sal+água; # $p \leq 0,05$  vs. grupo m-AMPHs+água de acordo com o teste ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Tukey

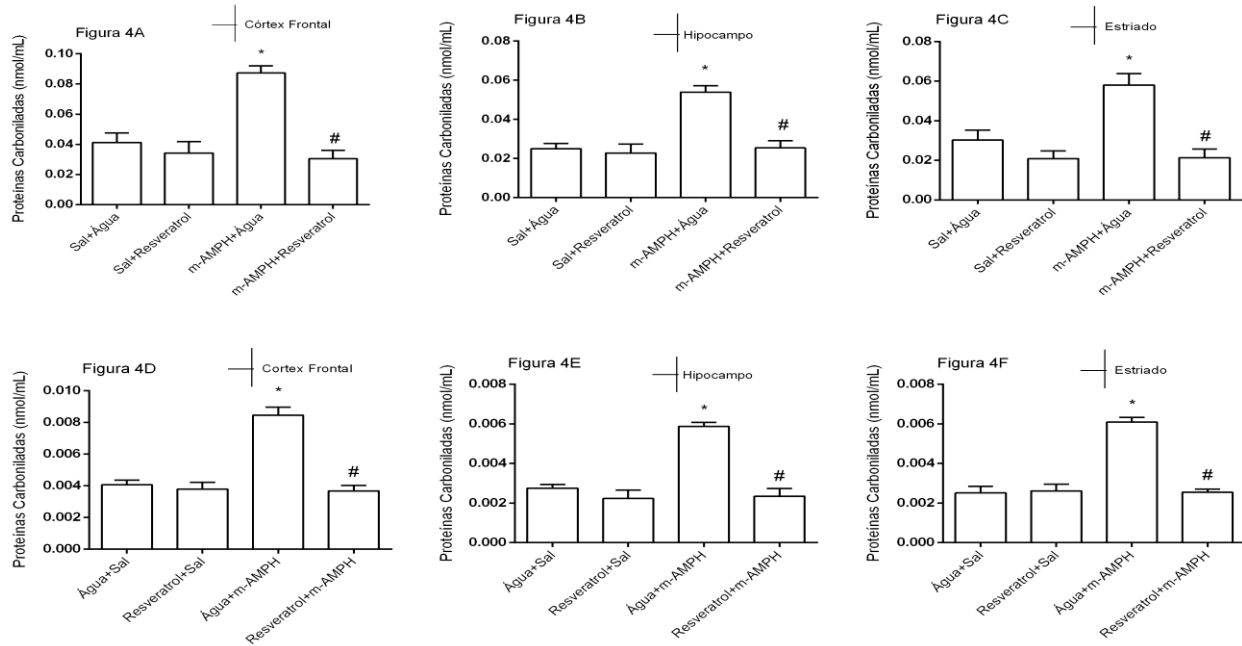
Os níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal, hipocampo e estriado são apresentados na **figura 8** onde mostra os efeitos do resveratrol no tratamento de ratos submetidos ao modelo de mania induzido por m-AMPHs, nos modelos de reversão (**A**, **B** e **C**) e prevenção (**D**, **E** e **F**). Como pode ser observado a administração de m-AMPHs aumentou os níveis de 3-nitrotirosina em todas as regiões cerebrais avaliadas, indicando dano nitrosativo a proteínas cerebrais. A administração de resveratrol também reverteu e preveniu esse dano nitrosativo a proteína em todas as regiões cerebrais avaliadas.



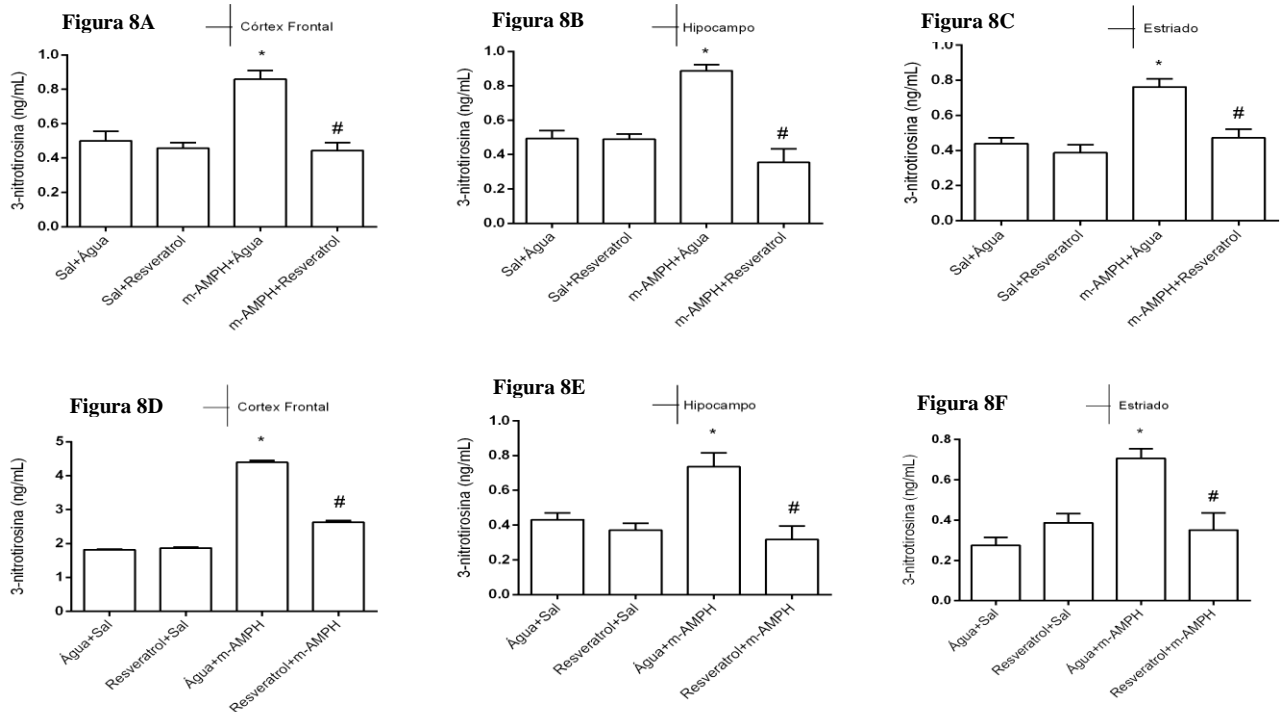
**Figura 5:** Efeitos do resveratrol sobre os níveis de TBARS no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão (A, B e C) e de prevenção (D, E e F). Barras representam média, barras de erro representam desvio padrão; \* $p \leq 0,05$  vs. grupo Sal+água; # $p \leq 0,05$  vs. grupo m-AMPHs+água de acordo com o teste ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Tukey



**Figura 6:** Efeitos do resveratrol sobre os níveis de 4-HNE no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão (A, B e C) e de prevenção (D, E e F). Barras representam média, barras de erro representam desvio padrão; \* $p \leq 0,05$  vs. grupo Sal+água; # $p \leq 0,05$  vs. grupo m-AMPHs+água de acordo com o teste ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Tukey.



**Figura 7:** Efeitos do resveratrol sobre os níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão (A, B e C) e de prevenção (D, E e F). Barras representam média, barras de erro representam desvio padrão; \* $p < 0,05$  vs. grupo Sal+água; # $p < 0,05$  vs. grupo m-AMPHs+água de acordo com o teste ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Tukey



**Figura 8:** Efeitos do resveratrol sobre os níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPHs nos modelos de reversão (A, B e C) e de prevenção (D, E e F). Barras representam média, barras de erro representam desvio padrão; \* $p \leq 0,05$  vs. grupo Sal+água; # $p \leq 0,05$  vs. grupo m-AMPHs+água de acordo com o teste ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Tukey.

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas utilizando análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Em todas as comparações, significância estatística foi considerada para  $p \leq 0,05$ . Os testes estatísticos foram realizados no software STATISTICA7® e os gráficos foram preparados no software GraphPad Prism5®.



## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo pode ser observado que a administração de m-AMPHs nos ratos aumentou a locomoção e a exploração dos animais, os quais são considerados comportamentos do tipo maníaco. O modelo animal de mania induzido por AMPHs são considerados bons modelos animais para o estudo da mania bipolar pois possui as três validades necessárias para ser considerado um bom modelo animal: 1) validade de face, que é a habilidade que o modelo tem de mimetizar os sintomas/comportamento de um determinado transtorno; 2) validade de constructo, que é a habilidade que o modelo tem de mimetizar a fisiopatologia do determinado transtorno; e 3) validade preditiva, a habilidade que o modelo tem em mimetizar o tratamento farmacológico do determinado transtorno (Ellenbroek e Cools, 1990). Corroborando com nossos resultados e confirmando a validade de face do modelo, vários estudos anteriores demonstraram que a administração de m-AMPHs em ratos aumentou a atividade locomotora, exploratória, comportamento de risco e comportamentos estereotípicos nos animais (Feier et al., 2012, da-Rosa et al., 2012b; Feier et al., 2013). Além disso, o tratamento com Li e VPA, estabilizadores do humor clássicos utilizados para o tratamento do TB, revertem comportamentos do tipo maníaco induzidos por m-AMPHs (Feier et al., 2013). Portanto, a administração de m-AMPHs em ratos mimetiza também o tratamento farmacológico do TB, o que confirma também a validade preditiva do modelo.

Estudos prévios descreveram dois principais mecanismos de ação das AMPH: um deles é fazer com que as vesículas que contêm a dopamina se movam em direção à membrana terminal. Desta forma, as vesículas se fundem com a membrana terminal liberando a dopamina. Outro mecanismo é a liberação da dopamina no citoplasma do neurônio terminal. Essas moléculas de dopamina são subsequentemente levadas para o exterior da célula via transporte reverso do transportador de dopamina. O resultado é um maciço aumento na concentração de dopamina na sinapse e, conseqüentemente, uma significativa estimulação do sistema dopaminérgico (Schaeffer et al., 1976; Hoffman e Lefkowitz, 1996). A exposição à AMPHs por longos períodos de tempo pode induzir alterações do sistema dopaminérgico, causar dano

neuronal e também alterações comportamentais semelhantes as observadas em pacientes bipolares (Feier et al., 2012; 2013). É bem descrito na literatura que a AMPHs induz sintomas maníacos em pacientes com TB (Joyce et al., 1995), bem como em voluntários saudáveis (Anand et al., 2000). Além disso, níveis elevados de dopamina na urina foram associados à emergência de episódios maníacos (Joyce et al., 1995). E estudos clínicos demonstram mudanças em receptores de dopamina em pacientes com TB (Pantazopoulos et al., 2004). Além disso estudos *post-mortem* tem apresentado resultados onde, pacientes bipolares apresentam alterações em um alelo do gene codificador do transportador de DA, levantando a hipótese de que essa mudança pode estar ligado ao aumento dos níveis de DA no cérebro desses pacientes (Pinsonneault et al., 2011). Juntos, estes estudos sugerem que o sistema dopaminérgico pode ter um papel importante na fisiopatologia do TB e ajudam a confirmar que as alterações no sistema dopaminérgico induzidos pela m-AMPHs representam a validade de constructo do modelo animal de mania induzido por essa substância.

No presente estudo a administração de resveratrol não reverteu nem preveniu o aumento da atividade locomotora e exploratória induzidas pela m-AMPHs. Entretanto, no modelo de reversão o grupo m-AMPHs+resveratrol não foi diferente estatisticamente do grupo controle (cruzamentos e levantamentos), o que pode indicar uma melhora parcial do comportamento do tipo maníaco induzido pela m-AMPHs. No modelo de prevenção, o mesmo pode ser observado no número de levantamentos, sendo que o grupo resveratrol+m-AMPHs também não foi diferente estatisticamente do grupo controle, podendo indicar uma prevenção parcial do comportamento do tipo maníaco induzido pela m-AMPHs. De acordo com nossos resultados, Miller e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de resveratrol, nas doses de 1, 10 ou 20mg/kg, durante 7 dias atenuou, mas não reverteu, a hiperatividade induzida pela m-AMPHs. Entretanto, neste mesmo estudo de Miller et al. (2013), o tratamento com resveratrol não foi capaz de reverter a hiperatividade induzida pela cocaína. Em um estudo *in vitro* foi demonstrado que resveratrol protegeu neurônios dopaminérgicos mesencefálicos contra a neurotoxicidade induzida pela m-AMPHs (Sun et al., 2015). Sun e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento com resveratrol aumentou a viabilidade celular e

retardou a apoptose celular induzida pela m-AMPHs. Além disso, neste mesmo estudo foi encontrado que resveratrol atenuou o aumento de ERO induzidas pela m-AMPHs nos neurônios dopaminérgicos. Juntos com nossos dados, estes estudos sugerem que o tratamento com resveratrol pode proteger o sistema dopaminérgico contra o dano induzido pela m-AMPHs e modular, pelo menos em parte, as alterações comportamentais induzidas por essa substância.

No presente estudo foi demonstrado que a m-AMPHs induziu dano oxidativo a lipídios e a proteínas no cérebro dos animais submetidos ao modelo animal de mania. Aqui foi demonstrado que m-AMPHs aumentou os níveis de TBARS, de 4-HNE e de carbonilação de proteínas no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos aos modelos de mania de reversão e de prevenção. De acordo com os nossos resultados, estudos prévios têm demonstrado que a administração de m-AMPHs aumenta peroxidação lipídica e dano oxidativo a proteína, avaliados também, através da quantificação de TBARS e de carbonilação de proteínas (da-Rosa et al., 2012b; Feier et al., 2012; 2013). É bem descrito na literatura que a neurotoxicidade das AMPHs resulta de ERO que são formados a partir da oxidação da dopamina. Além da dopamina, a oxidação de outros neurotransmissores, como a serotonina e a norepinefrina, pela monoamina oxidase é a principal mecanismo de geração de  $H_2O_2$  no cérebro (Halliwell 2001). O papel do glutamato no mecanismo de ação das AMPHs tem sido estudado nos últimos anos; entretanto, alguns estudos descrevem que o glutamato tem uma importante relação nos efeitos dessa substância (Tata e Yamamoto 2007). Alguns desses efeitos e mecanismos de ação serão descritos a seguir. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, e a elevação prolongada da concentração desse neurotransmissor possui efeitos tóxicos, pelo aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  e ativação da óxido nítrico sintase (NOS) (Garthwaite, 1991; Dawson e Dawson, 1996). O NO é sintetizado enzimaticamente pela NOS; portanto, o aumento excessivo de NOS e, conseqüentemente, de NO pode nitrosilar proteínas, causando danos a essas macromoléculas (Poon et al. 2004). Deste modo, podemos sugerir que no presente estudo a m-AMPHs induziu dano a proteínas e a lipídios através da produção de ERO e de nitrogênio. Pois sabe-se que as AMPHs induzem a formação de radicais livres através do catabolismo oxidativo da

dopamina e, conseqüentemente, geram disfunção da respiração mitocondrial (Burrows et al., 2000 ; Cadet et al., 2005 ; Deng et al. , 2002 , Valvassori et al., 2010).

Um estudo prévio demonstrou que a m-AMPH induz um dano oxidativo a lipídios e a proteínas maior do que o d-AMPH, mostrando diferenças neuroquímicas anteriormente desconhecidas (da-Rosa et al, 2012b). Dessa forma é importante ressaltar que o dano oxidativo induzido pela m-AMPHs no cérebro de ratos reforça a validade de constructo do modelo animal, já que a fisiopatologia do TB também está ligada a danos oxidativos a biomoléculas, tanto no sangue quanto no cérebro dos pacientes (Siwek et al., 2016; Tsai and Huang, 2015; Andreatza et al., 2010; Andreatza et al., 2013). Inclusive o dano oxidativo às proteínas vem sendo relatado tanto em pacientes diagnosticados com TB quanto com depressão maior, sendo encontrados níveis elevados de carbonilação de proteína no conteúdo sérico no sangue desses pacientes (Magalhães et al., 2012). Um estudo clínico prévio demonstrou um aumento dos níveis de TBARS no soro de pacientes bipolares nas fases agudas de mania, hipomania e depressão (Siwek et al., 2016). Tsai e Huang (2015) também encontraram níveis de TBARS aumentados em pacientes bipolares na fase maníaca, quando comparado com os voluntários saudáveis. Além disso, estudos *post-mortem* têm demonstrado um aumento de carbonilação de proteínas, 3-nitrotirosina e 4-HNE no córtex frontal de pacientes bipolares, quando comparado com indivíduos saudáveis (Andreatza et al., 2010; Andreatza et al., 2013; Kunz et al, 2008). Um estudo anterior de Andreatza e colaboradores (2009) demonstrou aumento significativo nos níveis de 3nitrotirosina no sangue de pacientes com TB nas fases precoces e tardias. Tendo em vista que o estresse oxidativo tem papel importante na fisiopatologia do TB, seria interessante que as novas substâncias com potencial efeito estabilizador de humor apresentassem efeitos antioxidantes, com o intuito de proteger o cérebro dos pacientes contra os danos deletérios das ERO.

Os dados do presente estudo mostraram que a administração de resveratrol reverteu e preveniu o dano oxidativo e nitrosativo aos lipídios e proteínas induzidos pela m-AMPHs no córtex frontal, hipocampo e estriado dos animais submetidos ao modelo animal de mania. Sun e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento com

resveratrol aumentou a viabilidade celular, retardou a apoptose celular e atenuou os níveis de ERO induzidos pela m-AMPHs em uma cultura de neurônios dopaminérgicos. Tadolini e colegas (2000) também demonstraram que o resveratrol inibiu a peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células de uma cultura *in vitro*. Os dados deste estudo indicaram que o resveratrol inibiu a peroxidação de lipídeos, principalmente, pela retirada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de dentro da membrana celular. Ainda, os autores demonstraram que resveratrol possui a capacidade de entrar espontaneamente no ambiente lipídico, o que pode explicar sua eficiência como antioxidante. Corroborando com os nossos resultados, um estudo prévio, em que foi realizado o tratamento crônico com resveratrol (10 e 20 mg/kg) durante 25 dias melhorou o comprometimento cognitivo induzido por colchicina e reduziu os níveis de TBARS no cérebro dos animais. Além disso, o tratamento com resveratrol restabeleceu a atividade de GSH, que é uma enzima antioxidante com importante função no sistema nervoso central (Kumar et al., 2007). Khan e colaboradores (2010) encontraram que a administração de resveratrol também preveniu o aumento de TBARS e proteínas carboniladas no cérebro de ratos submetidos e 6-hidroxidopamina em um modelo animal de Parkinson.

Um estudo prévio encontrou que a administração intraperitoneal de resveratrol diminuiu os níveis de TBARS, de forma dose-dependente, no cérebro de ratos saudáveis. Além disso, esses mesmos autores encontraram que o resveratrol aumentou, também de forma dose-dependente, a atividade da SOD, CAT e peroxidases (Mokni et al., 2009). É importante salientar que no presente estudo a administração de resveratrol *per se* não alterou os níveis de TBARS nem de carbonil no cérebro dos ratos. Essa discrepância pode ser explicada, pelo menos em partes, por diferenças metodológicas entre os estudos. O presente estudo administrou resveratrol via oral, enquanto que no estudo de Mokni et al. (2009) foi administrado intraperitoneal. Ainda, no presente estudo o resveratrol foi diluído em água, enquanto que no estudo prévio os autores diluíram o resveratrol em álcool.

É bem descrito na literatura que o resveratrol tem propriedades antioxidantes, e via oral está sendo relatado como benéfico no tratamento de doenças neurológicas, atuando, principalmente, no processo de estresse oxidativo (Singh, 2013). Além disso, o resveratrol possui a

capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, o que também facilita seus efeitos antioxidantes sobre o sistema nervoso central (Baur et al., 2006; Tadolini, 2000). A estrutura química do resveratrol permite que ele remova diretamente os radicais livres por transferência de átomos de hidrogênio e perda sequencial de prótons na transferência de elétrons, o que pode modular a sinalização celular e diminuir o dano oxidativo (Shang et al., 2009). Outro mecanismo de ação do resveratrol contra o estresse oxidativo é via ativação do Nrf2 (Lee et al 2003; Vargas e Johnson 2009; Singh, 2013). O Nrf2 é um fator de transcrição, que é expresso em todo o cérebro (Moi et al 1994) e possui um papel fundamental nas defesas celulares contra o estresse oxidativo. Essa proteína atua regulando marcadores inflamatórios e aumentando a expressão de enzimas antioxidantes (Innamorato et al 2008; Shah et al 2007). Portanto, no presente estudo podem ser sugeridos 2 possíveis efeitos neuroprotetores do resveratrol contra o dano oxidativo a proteínas e a lipídeos cerebrais: 1) o resveratrol pode estar removendo diretamente os radicais livres produzidos pela oxidação da dopamina induzida pela m-AMPHs; 2) o resveratrol pode estar ativando Nrf2, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes, protegendo o cérebro contra o dano oxidativo induzido pela m-AMPHs.

No presente estudo, a administração de resveratrol reverteu e preveniu o dano nitrosativo a proteína, induzido pela m-AMPHs, em todas as regiões cerebrais avaliadas. Em um estudo prévio, o tratamento crônico com resveratrol nas doses de 10 e 20 mg/kg reverteu o comprometimento cognitivo induzido por colchicina e reduziu os níveis de nitrito no cérebro dos animais (Kumar et al., 2007). Além disso, um estudo utilizando células microgliciais N9 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) demonstrou que o tratamento com resveratrol diminuiu óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), levando a diminuição de NO, o que, conseqüentemente, diminuiu a inflamação e o dano nitrosativo (Bi et al., 2005). O óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é responsável pela produção de NO como vasodilatador no endotélio, enquanto a iNOS promove a NO inflamatório, como resultado da ativação celular imune (Zamora et al., 2000). O NO é um radical livre gasoso e seus níveis elevados podem ser um indicador de estresse nitrosativo. Alguns estudos têm demonstrado que o resveratrol possui a capacidade de aumentar a expressão e atividade de eNOS, enquanto

inibe iNOS, resultando num aumento da produção de NO vasoprotetor e diminuição de NO neurotóxico (Simao et al., 2012c; Wallerath et al., 2002, Xia et al., 2010; Tsai et al., 2007). Portanto, pode ser sugerido que no presente estudo o mecanismo de proteção do resveratrol contra o dano nitrosativo a proteínas induzido pela m-AMPHs é via inibição de iNOS.

Apesar do TB e da doença de Alzheimer serem distintas em alguns aspectos, estudos tem sugerido semelhanças nos mecanismos de neuroinflamação, excitotoxicidade e metabolismo cerebral. Embora a inflamação e o estresse oxidativo não sejam as principais causas dessas doenças, sabe-se que os dois casos são beneficiados pelas interações entre os fatores relacionados a esses distúrbios neuropsiquiátricos complexos durante o envelhecimento cerebral, causando um desequilíbrio entre os fatores protetores e degenerativos, que predispõe o cérebro a doenças neurodegenerativas (Lewandowski et al., 2011; Rao et al., 2010, 2011; Forcada et al., 2015 ). Por essa razão foram comparados a seguir estudos que avaliaram os benefícios do resveratrol na doença de Alzheimer, principalmente, nos aspectos semelhantes ao que ocorre no TB. Anekonda em 2006 já havia relatado que o resveratrol havia reduzido significativamente o dano cerebral causado por isquemia, acidente vascular cerebral, convulsão e epilepsia. Em sua pesquisa, com um modelo animal da doença de Huntington, Anekonda (2006) sugeriu que o resveratrol pode possuir valor terapêutico para a degeneração neuronal, pois nesse estudo o resveratrol induziu o SIRT1 e considerou-se que ele foi capaz de proteger os neurônios contra a toxicidade do poliglutamina (polyQ) que de acordo com Reid e colaboradores (2004) quando acumulada pode ser um fator contribuinte na doença de Alzheimer. Um estudo realizado por Chen e colegas (2005) em modelos *in vitro* da doença de Alzheimer mostrou que, ao ativar o *SIRT-1*, o resveratrol inibiu indiretamente também a sinalização do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) resultando em proteção contra a toxicidade  $\beta$ -amilóide dependente da micróglia. Concordando com esses resultados Kim et al 2007 encontraram dados semelhantes em dois modelos animais de doenças neurodegenerativas, doença de Alzheimer e a ELA. Eles descobriram que o resveratrol reduziu significativamente a extensão da morte celular neuronal e neurotoxicidade nos modelos e reduziu a neurodegeneração no hipocampo e resgatou a aprendizagem

associativa em um modelo animal de doença de Alzheimer utilizando camundongos p25.

Outro ponto estudado é a redução da densidade neuronal e glial observadas no pré-frontal e no hipocampo de pacientes com TB (Ongür et al., 1998; Liu et al., 2007; Vostrikov et al., 2007), alguns estudos sugerem inclusive que os comprometimentos dessas estruturas cerebrais estão ligados as alterações cognitivas e comportamentais, que são características dos pacientes bipolares. Estudos indicam que alterações em vias de sinalização do BDNF e o aumento de estresse oxidativo podem ser os fatores chaves ligados a morte celular, observados no cérebro de pacientes bipolares e, possivelmente uma explicação para a fisiopatologia do TB (Carter et al., 2007; Kapczinski et al., 2008a; b; 2011). Conforme o crescente número de estudos sobre o resveratrol e seus efeitos sobre diversas doenças, inclusive na prevenção da doença de Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington, transtornos psiquiátricos e outras doenças neurológicas, o transformou em uma grande promessa na prevenção de males comuns aos seres humanos (Anekonda, 2006). É importante ressaltar que, nesse estudo, apesar do resveratrol não oferecer melhora no comportamento maníaco, causou efeito neuroprotetor aos danos oxidativo no cérebro dos ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido pela administração de m-AMPHs, e levantou a hipótese de que essa proteção pode vir a auxiliar também no tratamento dos pacientes com TB, pois seu efeito neuroprotetor contra os danos oxidativo pode evitar e/ou retardar a neurodegeneração. Dessa forma é importante que surjam mais resultados com os ensaios clínicos e pré-clínicos, e necessário mais pesquisa para entender completamente os mecanismos pelos quais o resveratrol exerce seus efeitos e garantir que, de fato, não existam quaisquer efeitos colaterais adversos a longo prazo (Anekonda, 2006; Markus; Morris 2008).

Em conclusão, os dados do presente estudo mostram que o resveratrol não previne nem reverte completamente o comportamento do tipo maníaco induzido pela m-AMPHs. Entretanto, o resveratrol preveniu e reverteu o dano oxidativo a proteínas e lipídeos cerebrais induzidos pela m-AMPHs. Tendo em vista que o estresse oxidativo tem papel importante na fisiopatologia do TB, seria interessante que as novas substâncias com potencial efeito estabilizador de humor



apresentassem efeitos antioxidantes, com o intuito de proteger o cérebro dos pacientes contra os danos deletérios das ERO. Por isso, a suplementação de resveratrol em pacientes bipolares pode ser considerado como um possível tratamento adjunto aos estabilizadores de humor utilizados na clínica médica.

## REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. V ed. Washinton, DC: American Psychiatric Publishing; 2013.

Anand A, Verhoeff P, Seneca N, Zoghbi SS, Seibyl JP, Charney DS, Innis RB. Brain SPECT imaging of Amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *Am J Psychiatry*.2000;157(7):1108-14.

Anekonda TS. Resveratrol - a blessing for the treatment of Alzheimer's disease? *Brain Res Rev*.2006;52(2):316-26

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.

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

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

Bastianetto S, Ménard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*.2015;1852(6):1195-201.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves the health and survival of mice with a high calorie diet. *Nature*.2006;444(7117):337-42.

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

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.

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.

Beyer JL, Payne ME. Nutrition and Bipolar Depression. *Psychiatr Clin North Am*. 2016;39(1):75-86.

Bi XL, Yang JY, Dong YX, Wang JM, Cui YH, Ikeshima T, Zhao YQ, Wu CF. resveratrol inhibits nitric oxide and TNF- $\alpha$  production by lipopolysaccharide-activated microglia. *International Immunopharmacology*.2005;5:185–193.

Blanchet JL, Devaux F, Furfaro L, Lantz E. Measurement of sub-shot-noise correlations of spatial fluctuations in the photon-counting regime. *Phys Rev Lett*. 2008;101(23):233604.

Boger HA, Middaugh LD, Huang P, Zaman V, Smith AC, Hoffer BJ, Tomac AC, Granholm AC. A partial GDNF depletion leads to earlier

age-related deterioration of motor function and tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra. *Exp Neurol.* 2006; 202:336-47

Bonaga, G.; Pallotta, U.; Syrgi, K. Influenza delle sostanze polifenoliche sulla qualità dei vini bianchi. Parte prima. *Vini d'Italia*, Brescia, 1990;4:13-30,

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.

Burrows KB, Gudelsky G, Yamamoto BK. Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3, 4-methylenedioxymethamphetamine administration. *Eur J Pharmacol.* 2000;398:11-18.

Cadet JL, Jayanthi S, Deng X. Methamphetamine-induced neuronal apoptosis involves the activation of multiple death pathways. *Neurotoxicity Research.* 2005;8:199-206.

Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid beta toxicity through inhibition of NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:40364-74.

Chiu CT; Chuang DM. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacol Ther.* 2010;128(2):281-304

Cipriani A, Pretty H, Hawton K, Geddes JR. Lithium in the Prevention of Suicidal Behavior and All-Cause Mortality in Patients With Mood Disorders: A Systematic Review of Randomized Trials. *American Journal Of Psychiatry*, [s.l.], *Am J Psychiatry.* 2005;162(10):1805-19.

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

Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudoux JL. Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res.*2014;58(1):7-21.

da-Rosa DD, Valvassori SS, Steckert AV, Arent CO, Ferreira CL, Borges JL, Varela RB, Mariot E, Dal-Pizzol F, Andersen ML, Quevedo J. Differences between dextroAMPHssetamine and methAMPHssetamine:behavioral changes and oxidative damage in brain of wistar rats. *J Neural Transm.*2012;119:31–38.

Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon MA. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience.*2009;159(3):993-1002.

Deng X, Cai NS, McCoy MT, Chen W, Trush MA, Cadet JL. Methamphetamine induces apoptosis in an immortalized rat striatal cell line by activating the mitochondrial cell death pathway. *Neuropharmacology.*2002;42:837–845.

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.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*1990;186:421–31.

Einat H, Yuan P, Szabo, ST, Dogra, SMJI, HK. Protein kinase c inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 2007; 55:123-131.

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

Feier, G, Valvassori, SS, Lopes-Borges, J, Varela, RB, Bavaresco, DV, Scaini, G, Morais, MO, Andersen, ML, Streck, EL, Quevedo J. Behavioral changes and brain energy metabolism dysfunction in rats treated with methAMPHssetamine or dextroAMPHssetamine. *Neurosci Lett.*2012;530:75-9.

Feier, G, Valvassori, SS, Varela, RB, Resende, WR, Bavaresco, DV, Morais, MO, Scaini, G, Andersen, ML, Streck, EL, Quevedo, J. Lithium and valproate modulate energy metabolism in an animal model of mania i/nduced by methAMPHssetamine. *Pharmacol Biochem Behav.*2013;103:89-96

Flanzy, C. *Enologia. Fundamentos científicos y tecnológicos.* Madri: Mundi-Prensa, 2000.

Fremont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*2000;66:663–673.

Frey BN, Andreazza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.*2006a;13:281–6.

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

Friedman, G.D.; Klatsky, A.L. Is alcohol good for your health? *New England Journal Medicine*, Waltham.1993;329:1882-1883.

Forcada I, Mur M, Mora E, Vieta E, Bartras-Faz D, Portella MJ. The influence of cognitive reserve on psychosocial and neuropsychological functioning in bipolar disorder. *Euro. Neuropsychopharmacol.*2015;25:214–222.

Fukui M, Yamabe N, Zhu BT. resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo *Eur J Cancer*.2010a;46(10):1882-91.

Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death *Free Radic Biol Med*.2010b;49(5):800-13.

Fukui M, Zhu BT. Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells. *Free Radic. Biol. Med*.2010c;48:821–830.

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;161:217–222.

Ghaemi SN, Lenox MS, Baldessarini RJ. Effectiveness and safety of long-term antidepressant treatment in bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2001;62(7):565-9.

Giralt A, Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J*.2012;444(1):1-10

Grande I, Berk M., Birmaher B., Vieta E. Bipolar disorder. *The Lancet*.2016;387(10027):1561–1572.

Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*.2004;53(1):110-8.

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

Gustafson DR, Clare Morris M, Scarmeas N, Shah RC, Sijben J, Yaffe K, Zhu X. New Perspectives on Alzheimer's Disease and Nutrition. *J Alzheimers Dis.*2015;46(4):1111-27.

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

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1<sup>a</sup> ed. Nova York: Oxford.2007.

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

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

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

Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. New York: McGrawHill; 1996. p.199-248.

Huhn S, Kharabian Masouleh S, Stumvoll M, Villringer A, Witte AV. Components of a Mediterranean diet and their impact on cognitive functions in aging. *Front Aging Neurosci.*2015;7:132.

Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.*2003;34(2):145-69.



Innamorato NG; Red AI; García-Yague AJ; Yamamoto M.; of Ceballos ML; Squared A. Transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J. Immunol.*2008;181:680-689.

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.

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.

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

Joyce, PR, Fergusson, DM, Woollard, G, Abbott, RM, Horwood, LJ, Upton, J. Urinary catecholamines and plasma hormones predict mood state in rapid cycling bipolar affective disorder. *J Affect Disord.*1995;33:233-43.

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

Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased

BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008b; 30(3):243-5.

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

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

Kendall T, Morriss R, Mayo-Wilson E, Marcus E;. Assessment and management of bipolar disorder: summary of updated NICE guidance. *Bmj*, [s.l.], 2014; 349: 32-37.

Kimura T, Takagi H, Suzuma K, Kita M, Watanabe D, Yoshimura N. Comparisons between the beneficial effects of different sulfonylurea treatments on retinal neovascularization induced by ischemia. *Radical free. Biol. Med.* 2007; 43: 454 – 461.

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

Krishnan, Vaishnav. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, [s.l.]. *Nature.* 2008; 455(7215):894–902.

Kulkarni SS; Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(6):1114-23.

Kumar, A. Naidu P.S., Seghal N, Padi S.S.V. Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Pharmacology.* 2007;79(1):17-26.

Kumar A, Negi G, Sharma SS. Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: concepts & mechanisms. *Curr Med Chem.* 2013;20(36):4640-5.

Kunz M, Gama CS, Andreazza 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.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*.1990;186:464–78.

Lewandowski K., Cohen B., Ongur D. Evolution of neuropsychological dysfunction during the course of schizophrenia and bipolar disorder. *Psychol Med*.2011;41(2):225-41.

Lloyd AJ, Harrison CL, Ferrier IN, Young AH. The pharmacological treatment of bipolar affective disorder: practice is improving but could still be better. *Journal Of Psychopharmacology*. 2003; 17(2):230-233.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*.1951;193:265-7.

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;11(2):92-10.

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 PVS, Costa MH, Pinheiro RT. Epidemiologia do transtorno bipolar. In: Kapczinski, F; Quevedo, J. editores. *Transtorno Bipolar. Teoria e clínica*. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 32

Martinowich, Keri; Schloesser, Robert J.; Manji, Husseini K. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. *J Clin Invest*.2009;119(4):726-736.

Manzanero S.; Santro T.; Arumugam T.; Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochemistry International*.2013;62(5):712-718.

Markus MA, Morris BJ. resveratrol in the prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clinical interventions in aging*.2008;3(2):331-339.

McKnight RF, Adida M, Budge K, Stockton S, Goodwin GM, Geddes JR. Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, [s.l.].2012;379(9817):721-728.

McNamara, RK; Strawn, JR. Non-heritable risk factors for bipolar disorder. S.M. In: Strakowski, M.P. DelBello, C.M. Adler (Eds.), *Progression of Bipolar Disorder in Youth: Presentation, Treatment, and Neurobiology*, Oxford University Press, NY, U.S.A.2014:109–130.

Merikangas KR, Akiskal HS, Angst J, Greenberg PE, Hirschfeld RM, Petukhova M, Kessler RC. Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. *Arch Gen Psychiatry*.2007;64:543–552.

Miller DK, Oelrichs CE, Sabio AS, Sun GY, Simonyi A. Repeated resveratrol treatment attenuates methAMPHssetamine-induced hyperactivity and [3H]dopamine overflow in rodents. *Neurosci Lett*.2013; 554:53-8.

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

Moreno, RA; Moreno, DH; Soares, MMB, Ratzke, R. Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar. *Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar*. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo,2004;26(3):37-43.

Moretti M, Valvassori SS, Varela RB, Ferreira CL, Rochi N, Benedet J, Scaini G, Kapczinski F, Streck EL, Zugno AI, Quevedo J. Behavioral

and neurochemical effects of sodium butyrate in an animal model of mania. *Behav Pharmacol.*2011;22:766-72.

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.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat. neurosc.* 2010;13:1161-1169.

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

Novick DM, Swartz HA, Frank E. Suicide attempts in bipolar I and bipolar II disorder: a review and meta-analysis of the evidence. *Bipolar Disord.*2010;12(1):1-9.

Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem.* 2006;13(1):87-98.

Ohgami H, Terao T, Shiotsuki I, Ishii N, Iwata N. Lithium levels in drinking water and risk of suicide. *The British Journal Of Psychiatry, [s.l.]*, 2009;194(5): 464-465.

Ongür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1998;95(22):13290-5.

Organização Mundial da Saúde: Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre, Artmed;1993.

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.

Pantazopoulos H, Stone D, Walsh J, Benes FM. Differences in the cellular distribution of d1 receptor mrna in the hippocampus of bipolars and schizophrenia. *Synapse*.2004; 54:147-155.

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.

Pinsonneault JK, Han DD, Burdick KE, Katakaki M, Bertolino A, Malhotra AK, Gu HH, Sadee W. Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*.2011;36(8):1644-55.

Pompili M, Gonda X, Serafini G, Innamorati M, Sher L, Amore M, Rihmer Z, Girardi P. Epidemiology of suicide in bipolar disorders: a systematic review of the literature. *Bipolar Disord*.2013;15(5):457-90.

Quiroz JA, Gray NA, Kato T, Manji HK: Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*.2008;33:2551-2565.

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.

Reid SJ, Van Roon-Mom WM, PC de madeira, Rees MI, Owen MJ, Faull RL, Dragunow M, Snell RG. TBP, a polyglutamine tract containing protein, accumulates in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*.2004;125(1-2):120-8.

Ribeiro M, Laranjeira R, Cividanes G. Bipolar disorder and substance abuse. *Rev Psiqu Clín*.2005;32:78-88.

Rosenblat, JD; McIntyre, RS Bipolar Disorder and Inflammation. *Psychiatr. Clin. N. Am.* 2016;39:125-137.

Sachs GS, Printz DJ, Kahn DA, Carpenter D, Docherty JP. The Expert Consensus Guideline Series: Medication Treatment of Bipolar Disorder. *2000*:1-104

Sadi G, Konat D. Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol.* 2016;54(7):1156-63.

Schaeffer JC, Cho AK, Fischer JF. Inhibition of synaptosomal accumulation of InorepinephrineII: N-aryloxyalkylphentermines, quaternary d-AMPHssetamines, and 3-aryloxypropylamines. *J Pharm Sci.* 1976; 65:122-6.

Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Corrêa M, da Rosa MM, Rubin MA, Chitolina Schetinger MR, Morsch VM. resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 200;610(1-3):42-8.

Shah ZA; Li RC; Thimmulappa RK; Kensler TW; Yamamoto M .; Biswal S .; Doré S. Role of reactive oxygen species in the modulation of Nrf2 after ischemic reperfusion injury. *Neuroscience.* 2007;147:53-59.

Singh K.C., Kumar A., LaVoie A.L., Di Pipette D.J., Singh U.S. Diabetic complications in pregnancy: is resveratrol a solution? *Exp. Biol. Med.* 2013, pp. 1-9

Siwek M, Sowa-Kucma M, Styczen K, Misztak P, Szewczyk B, Topor-Madry R, Nowak G, Dudek D, Rybakowski JK. Thiobarbituric Acid-Reactive Substances: Markers of an Acute Episode and a Late Stage of Bipolar Disorder. *Neuropsychobiology.* 2016;73(2):116-22.

Simao F, Pagnussat AS, Seo JH, Navaratna D, Leung W, Lok J, Guo S, Waeber C, Salbego CG, Lo EH. Pro-angiogenic effects of resveratrol in

brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases. *J Cereb Blood Flow Metab.*2012;32(5):884-95.

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

Subramaniam M, Abdin E, Vaingankar JA, Nan L, Heng D, Mccrone P, Chong SA. Impact of psychiatric disorders and chronic physical conditions on health-related quality of life: Singapore Mental Health Study. *J Affect Disord.* 2013;147(1-3):325-30.

Sun D, Yue Q, Guo W2, Li T, Zhang J, Li G, Liu Z, Sun J. Neuroprotection of resveratrol against neurotoxicity induced by methAMPHssetamine in mouse mesencephalic dopaminergic neurons. *Biofactors.*2015;41(4):252-60.

Tadolini B, Juliano C, Piu L, Franconi F, L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2000;33(1):105-14.

Tsai MC, Huang TL. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a state biomarker of oxidative stress in bipolar patients in a manic phase. *J Affect Disord.* 2015;173:22-6

Tsai SK, Hung LM, Fu YT, Cheng H, Nien MW, Liu HY, Zhang FB, Huang SS. resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *Journal of vascular surgery.*2007;46:346–353

Tondo L, Baldessarini RJ. Long-term lithium treatment in the prevention of suicidal behavior in bipolar disorder patients. *Epidemiol Psichiatr Soc.*2009;18(3):179-83.

Vacheron-Trystram MN, Braitman A, Cheref S, Auffray L. Antipsychotics in bipolar disorders. *Encephale.* 2004 Sep-Oct;30(5):417-24.



Valvassori, SS. Modelos animais de transtorno bipolar. In: Kapczinski, Flávio; Quevedo, João. *Transtorno Bipolar: Teoria e Clínica*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. Cap. 3. p. 45-58.

Valvassori SS, Budni J, Varela RB, Quevedo J. Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Rev. Bras. Psiquiatr.*2013;35(2):121–131.

Valvassori SS1, Moretti M, Kauer-Sant'Anna M, Roesler R, Petronilho F, Schwartsmann G, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effects of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist on D-amphetamine-induced oxidative stress in the rat brain. *J Neural Transm.*2010;117:309–316.

Vogel M; Pfeifer S; Schaub Rt; Grabe Hj; Barnow S; Yberger Hj; Cascorbi I. Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology.*2004;50:305-310.

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.

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.*2002;106:1652–1658.

Xia N, Daiber A, Habermeier A, Closs EI, Thum T, Spanier G, Lu Q, Oelze M, Torzewski M, Lackner KJ, Munzel T, Förstermann U, Li H. resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2010;335:149–154.

Young AH, Hammond JM.. Lithium in mood disorders: increasing evidence base, declining use? *The British Journal Of Psychiatry*, [s.l.],2007;191(6):474-476.

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

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

Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine.* 2000;6:347.

**ANEXOS**

## ANEXO A - PARACER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)



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



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO TRATAMENTO E PREVENÇÃO COM RESVERATROL SOBRE O COMPORTAMENTO, E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO ENERGÉTICO EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA DOPAMINÉRGICO", registrada com o protocolo nº 102/2016-2, sob a responsabilidade de Samira da Silva Valvassori, junto à equipe: Daniela V. Bavaresco, Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Gustavo C. Dal-Pont, Camila Leite Ferreira, Bruna Peterle, Fernanda Frederico Gava, Kerolen Trajano - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 13/12/2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2017 a 01/01/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de animais	80
Idade/Peso	60dias / 250-300g
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da 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:

Project title: "EFFECTS OF TREATMENT AND PREVENTION WITH RESVERATROLI ON BEHAVIOR, AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS AND ENERGY METABOLISM IN AN ANIMAL MODEL OF MANIA DOPAMINERGIC"


Protocol number: 102/2016-2

Principal Investigator: Samira da Silva Valvassori

Researchers: Daniela V. Bavaresco, Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Gustavo C. Dal-Pont, Camila Leite Ferreira, Bruna Peterle, Fernanda Frederico Gava, Kerolen Trajano.

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, 13 de dezembro de 2016.

  
 Jairo José Zocche  
 Coordenador da CEUA