

Tese de Doutorado

**ISOFORMAS DA PROTEÍNA QUINASE C COMO ALVO PARA
COMPORTAMENTOS DO TIPO MANÍACO E ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDOS POR METANFETAMINA EM UM MODELO ANIMAL DE
MANIA**

EDERBAL FOREST DA SILVA



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EDERBAL FOREST DA SILVA

**ISOFORMAS DA PROTEÍNA QUINASE C COMO ALVO PARA
COMPORTAMENTOS DO TIPO MANÍACO E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS
POR METANFETAMINA EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para
a titulação de doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Samira S. Valvassori

Co-orientador: Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586i Silva, Ederbal Forest da.
Isoformas da proteína quinase C como alvo
para comportamentos do tipo maniaco e
estresse oxidativo induzidos por
metanfetamina em um modelo animal de mania /
Ederbal Forest da Silva. - 2019.

77p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do
Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma,
2019.

Orientação: Samira da Silva Valvassori.
Coorientador: João Quevedo.

1. Metanfetamina. 2. Transtorno bipolar -
Tratamento. 3. Proteína quinase C. 4.
Estresse oxidativo. 5. Psicose maniaco-
depressiva. I. Título.

CDD 23. ed. 616.895

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

FOLHA INFORMATIVA

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Ederbal Forest da Silva**, sob o título “**ISOFORMAS DA PROTEÍNA QUINASE C COMO ALVO PARA COMPORTAMENTOS DO TIPO MANÍACO E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR METANFETAMINAS EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

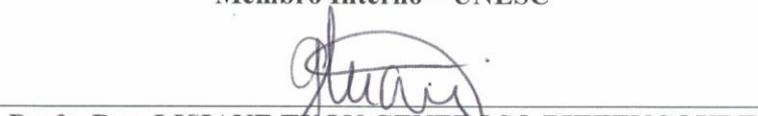
Criciúma, SC, 09 de julho de 2019.



Prof. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC



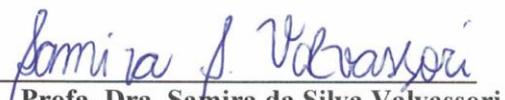
Prof. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Interno – UNESC



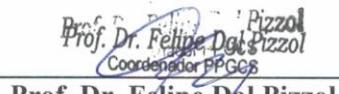
Prof. Dra. LISIANE TUON GENEROSO BITTENCOURT
Membro Externo – UNESC



Prof. Dra. TALITA TUON
Membro Externo – UFSC



Prof. Dra. Samira da Silva Valvassori
Orientadora



Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

Dedico essa tese de doutorado
à memória de meus pais,
ao meu irmão e amigos, por toda força, confiança
e os mais puros sentimentos que
depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Não posso começar com outro agradecimento se não à minha família. A memória de meus pais, **Francisco** e **Neli**, que sempre foram os maiores incentivadores da minha formação acadêmica. Sei que nunca serei capaz de retribuir de igual forma todo incentivo que recebi, mas todas as minhas conquistas são e serão em nome de vocês. Ao meu irmão **Narbal**, saiba que seu apoio sempre foi fundamental, e eu sempre serei muito grato por isso.

A toda a equipe do Laboratório de Psiquiatria Translacional por abrir as portas para que eu pudesse começar a trabalhar com pesquisa, em especial ao meu grande amigo **Doutor Arlindo Afonso**. A todos os professores do doutorado, ao professor **João Quevedo** meu coorientador. Agradeço por todo o conhecimento que me passaram e por todas as oportunidades que me ofereceram. Serão sempre referência de profissionais que irei levar para minha carreira.

Agradeço especialmente à **Samira Valvassori**, minha orientadora, que não mediu esforços para me ajudar em qualquer situação, sem a sua ajuda, tenho certeza que não teria chegado até aqui.

Meus agradecimentos à **UNESC** por me fornecer as melhores oportunidades para aprimorar meu conhecimento durante o doutorado. Agradeço também à **CAPES** pelo apoio financeiro e oportunidade de crescimento pessoal e acadêmico que tive durante o doutorado. Por fim, agradeço a todos que ajudaram direta ou indiretamente na minha formação e contribuíram para o meu crescimento. Meu muito obrigado!

RESUMO

Introdução: O transtorno bipolar (TB) é uma condição mental crônica caracterizada por graves alterações de humor, alternando-se entre episódios de mania e depressão. A mania é um estado anormalmente elevado de humor e a principal característica clínica deste transtorno. Evidências indicam que a proteína cinase C (PKC) e o estresse oxidativo desempenham funções importantes para a fisiopatologia do TB. Contudo, não está claro se os efeitos da PKC no TB envolvem a enzima total ou são dependentes de uma ou mais isoformas em particular. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da injeção intracerebroventricular (ICV) de inibidores de PKC (lítio [Li], tamoxifeno [TMX], inibidor da isoforma α da PKC [iPKC α], inibidor de PKC γ [iPKC γ] e inibidor de PKC ϵ [iPKC ϵ]) em comportamentos do tipo maníaco e parâmetros de estresse oxidativo em ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por metanfetamina (m-AMPH). **Material e Métodos:** Ratos adultos foram submetidos a uma única injeção intracerebroventricular de líquido cefalorraquidiano artificial, Li, TMX, iPKC α , iPKC γ ou iPKC ϵ , seguida por uma única administração intraperitoneal de salina (cloreto de sódio 0,9%) ou m-AMPH (1 mg por kg de peso corporal). Duas horas após a injeção intraperitoneal, foi realizada a análise comportamental por meio do teste de campo aberto. Os parâmetros comportamentais avaliados foram os seguintes: número de cruzamentos, levantamentos e visitas ao centro; e o tempo, em segundos, em que o animal limpa seu corpo (grooming) ou suas vibrissas (sniffing). Posteriormente, os parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados no córtex frontal, hipocampo e corpo estriado dos animais (4-hidroxi-2-nonenal e 8-isoprostano, como marcadores de dano a lipídeos; grupos carbonila e 3-nitrotirosina, para dano a proteínas; determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e glutathiona redutase). **Resultados:** A microinfusão de Li, TMX ou iPKC ϵ preveniu o aumento no número de cruzamentos, levantamentos e visitas ao centro dos animais. Adicionalmente, a administração destes fármacos colaborou para a diminuição dos tempos de grooming e sniffing, os quais são importantes parâmetros de comportamento do tipo estereotípico. A injeção de Li, TMX ou iPKC ϵ também preveniu o aumento nos níveis de marcadores de dano oxidativo e anormalidades na atividade das enzimas antioxidantes induzidos por m-AMPH em todas as estruturas cerebrais analisadas. A administração de iPKC α preveniu a maioria dos comportamentos supracitados nos animais (não provocou efeito significativo no número de levantamentos). O iPKC α ou iPKC γ foram implicados em redução dos níveis de grupos carbonila no corpo estriado, enquanto que a infusão de iPKC γ colaborou para uma redução nos níveis de 3-nitrotirosina nesta mesma estrutura cerebral. **Conclusão:** Os achados sugerem que os efeitos antimaníacos e antioxidantes do Li, TMX e os inibidores específicos de PKC envolvem, ao menos em parte, a isoforma PKC ϵ . O iPKC ϵ foi o inibidor específico que mais apresentou eficácia ao prevenir as alterações desencadeadas pela administração de m-AMPH. Demais estudos são necessários para o melhor entendimento destes efeitos dos inibidores de PKC no TB e, possivelmente, para o desenvolvimento de novas estratégias baseadas exclusivamente na inibição desta enzima.

Palavras-chave: Metanfetamina; modelo animal de mania; transtorno bipolar; mania; proteína cinase C.

ABSTRACT

Introduction: Bipolar disorder (BD) is a chronic mental condition characterized by severe mood swings, alternating between episodes of mania and depression. Mania is an abnormally high state of mood and the clinical hallmark of this disorder. Evidence indicates that protein kinase C (PKC) and oxidative stress play important roles in the BD pathophysiology. However, it is unclear whether the PKC effects of on the BD involve the total enzyme or are dependent on one or more particular isoforms. The aim of the present study was to evaluate the effects of intracerebroventricular (ICV) infusion of PKC inhibitors (lithium [Li], tamoxifen [TMX], PKC α isoform inhibitor [iPKC α], PKC γ inhibitor [iPKC γ] or PKC ϵ inhibitor [iPKC ϵ]) on the manic behaviors and oxidative stress parameters in rats submitted to the animal model of methamphetamine-induced mania (m-AMPH). **Material and methods:** Adult rats were subjected to a single ICV injection of artificial cerebrospinal fluid, Li, TMX, iPKC α , iPKC γ or iPKC ϵ followed by a single intraperitoneal administration of saline (0.9% sodium chloride) or m-AMPH (1 mg/kg body weight). Two hours after the intraperitoneal injection, an behavioral analysis through the open field test was carried out. The behavioral parameters evaluated were: number of crossings, rearings, and visits to the center; and the time, in seconds, in which the animal cleanses its body (grooming) or its vibrissas (sniffing). Later, oxidative stress parameters were evaluated in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of the animals (4-hydroxy-2-nonenal and 8-isoprostane as the lipid damage markers; carbonyl groups and 3-nitrotyrosine as the protein damage parameters; determination of the activity of antioxidant enzymes – glutathione peroxidase and glutathione reductase). **Results:** The microinfusion of Li, TMX or iPKC ϵ in the animals prevented the increase in the number of crossings, rearings and visits to the center. In addition, the administration of these drugs contributed to a decrease in the times of grooming and sniffing, which are important parameters of stereotypical behavior. Injection of Li, TMX or iPKC ϵ also prevented the increase in markers levels of oxidative damage and the aberrant activity of the antioxidant enzymes induced by m-AMPH in all brain structures analyzed. Administration of iPKC α prevented most of the above behaviors (did not cause significant effect on the number of rearings). iPKC α and iPKC γ were implicated in decrease in the levels of carbonyl groups in striatum while iPKC γ infusion contributed to a reduction in 3-nitrotyrosine levels in this same brain structure. **Conclusion:** The findings suggest that the antimanic and antioxidant effects of Li, TMX and PKC specific inhibitors involve, at least in part, the PKC ϵ isoform. iPKC ϵ was the specific inhibitor that was most effective in preventing the changes triggered by the administration of m-AMPH. Further studies are required to a better understanding on these effects of PKC inhibitors in BD and, possibly, the development of novel strategies based exclusively on the PKC inhibition.

Keywords: Methamphetamine; animal model of mania; bipolar disorder; mania; protein kinase C.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras 1A e 1B. Efeitos do tamoxifeno (TMX), lítio (Li), inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , iPKC γ e iPKC ϵ sobre o número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	40
Figura 1C. Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre o número de visitas ao centro do campo aberto de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	41
Figuras 1D e 1E. Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre o número de limpeza das vibrissas (1D) e número de auto-limpeza (1E), no teste de campo aberto, de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	42
Figuras 2A, 2B e 2C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) no córtex frontal (2A), no hipocampo (2B) e no estriado (2C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	43
Figuras 2D, 2E e 2F: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de 8-isoprostano (8-ISO) no córtex frontal (2D), no hipocampo (2E) e no estriado (2F) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	44
Figuras 3A, 3B e 3C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	45
Figuras 4A, 4B e 4C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao	

modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	46
Figuras 5A, 5B e 5C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre a atividade de glutationala peroxidase (GPx) no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	47
Figuras 5D, 5E e 5F: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre a atividade de glutationala redutase (GR) no córtex frontal (D), no hipocampo (E) e no estriado (F) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	35
-----------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete
3-NITRO – 3-nitrotirosina
4-HNE – 4-hidroxinonenal
8-ISO – 8-isoprostano
8-ISO-AChE – 8-ISO-acetilcolinesterase
aPKC – PKC atípica
ATP – adenosina trifosfato
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
CAT – catalase
CBD – canabidiol
CEUA – Comitê de Ético no Uso de Animais
CIDV – canal iônico dependente de voltagem
CPF – córtex pré-frontal
cPKC – PKC clássica ou convencional
d-AMPH – dextro-anfetamina
DAT – transportador de dopamina
DTT – ditionitrito
ERO – espécies reativas de oxigênio
GO – glutatona oxidase
GPx – glutatona peroxidase
GR – glutatona redutase
GSH – glutatona
GSS – glutatona dissulfeto
GT – glutatona transferase
GWAS – do inglês genome-wide association studies
ICV – intracerebroventricular
i.m. – intramuscular
IMAO – inibidor da monoaminoxidase
i.p. – intraperitonal
iPKC – inibidor específico de PKC
ISRS – inibidor seletivo da recaptação da serotonina
LCRa – líquido céfalo-raquidiano artificial

Li – lítio

m-AMPH – meta-anfetamina

MARCKS – substrato quinase C rico em alanina miristoilado

NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídica fosfato

NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

nPKC – nova PKC

PKC – proteína quinase C

PKC ϵ -TIP – peptídeo inibidor da translocação de PKC ϵ

SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SNC – sistema nervoso central

SNPs – polimorfismos de nucleotídeos únicos

SOD – superóxido dismutase

TB – transtorno bipolar

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TMX – tamoxifeno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR.....	17
1.2 FARMACOLOGIA NO TRANSTORNO BIPOLAR.....	18
1.3 O ESTRESSE OXIDATIVO NO TRANSTORNO BIPOLAR.....	20
1.4 PROTEÍNA QUINASE C E TRANSTORNO BIPOLAR.....	23
1.5 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR M-AMPH.....	27
1.6 JUSTIFICATIVA.....	29
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	33
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
3.2.1 Procedimentos cirúrgicos.....	33
3.2.2 Desenho experimental.....	33
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	35
3.3.1 Teste do campo aberto.....	35
3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	36
3.5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÉREBRO DE RATOS.....	36
3.5.1 Medidas de peroxidação lipídica.....	36
3.5.2 Medidas de nitração e oxidação de proteínas.....	37
3.6 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	37
3.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	38
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38

4 RESULTADOS.....	39
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	58
7 LIMITAÇÕES E DIREÇÕES FUTURAS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO	77

INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O transtorno bipolar (TB) é uma condição de saúde mental grave e complexa, caracterizada por episódios de mania e de depressão, com prevalência durante a vida de 2,4% da população mundial. Este transtorno causa alterações no comportamento social, envolvimento excessivo em comportamentos potencialmente problemáticos e/ou perigosos a ele e a terceiros (Karp e Tanarugsachock, 2000; El-Mallakh et al., 2003) e comorbidades médicas associadas como a hipertensão, diabetes, dentre outros (Merikangas et al., 2011). Nos pacientes com TB é comum a tentativa de suicídio e o suicídio consumado, sendo que de 9 a 15% dos pacientes cometem suicídio (Rihmer e Kiss, 2002; Simon et al., 2007b; Medici et al., 2015). O risco para a ocorrência de suicídio no TB é de aproximadamente 60 vezes maior comparado à população geral (Simon et al., 2007b).

O TB possui uma etiologia multifatorial, onde a interação dos fatores genéticos e ambientais estão envolvidos e são responsáveis pelo desenvolvimento do mesmo (Rowland e Marwaha, 2018). Apesar do impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, a fisiopatologia e a patogênese deste transtorno permanecem incertos (Saxena et al., 2018).

Uma característica fundamental para o diagnóstico de TB é apresentar comportamento maníaco ou hipomaníaco (Miller, 2016). Atualmente, o TB é dividido em tipo I, tipo II, ciclotímico e transtornos relacionados, dependendo da duração e intensidade dos episódios. Um episódio maníaco clássico é caracterizado pela presença de, no mínimo, cinco dos seguintes sintomas por um período de 7 dias: humor expansivo ou irritável, auto-estima inflada ou grandiosidade, redução da necessidade do sono, fuga de ideias, distrabilidade, agitação psicomotora, aumento da atividade sexual e comportamento de risco. O episódio maníaco pode incluir ainda sintomas psicóticos e hospitalizações. A hipomania é um estado semelhante à mania, porém mais leve. A hipomania não se apresenta com sintomas psicóticos, nem requer hospitalização. A duração mínima de quatro dias é necessária para a confirmação do diagnóstico. Os sintomas são

os mesmos da mania e também exclui como hipomania aquela induzida por antidepressivos (American Psychiatric Association, 2013).

Já um episódio depressivo é caracterizado pela presença de no mínimo cinco dos seguintes sintomas por um período maior que 15 dias: humor deprimido, perda de interesse ou prazer, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, retardo psicomotor, fadiga, perda de energia, diminuição da concentração, indecisão e pensamento recorrente de morte (American Psychiatric Association, 2013).

Existem diversas abordagens farmacológicas para o tratamento do TB, porém nem todos os pacientes aderem a monoterapia psicotrópica, fazendo com que o tratamento seja feito com polifarmácia psicotrópica (Young e Hammond, 2007). Além do tratamento farmacológico, a psicoeducação e a terapia cognitivo comportamental são indicadas pois exercem papel fundamental nos transtornos psiquiátricos em geral e no TB. Um dos objetivos destas abordagens psicológicas é contribuir na conscientização do paciente e familiares acerca dos sintomas da doença e na importância da adesão aos medicamentos. Muitos estudos têm demonstrado que a intervenção psicoterápica contribui para aumentar o tempo entre episódios e diminuir a gravidade dos mesmos, facilitando a reabilitação do paciente aos níveis social e laboral (Lam et al., 2003; Lam et al., 2005; Knapp e Beck, 2008; Vieta e Morilla, 2016).

1.2 FARMACOLOGIA NO TRANSTORNO BIPOLAR

O TB é um distúrbio complexo e possui uma variabilidade de características clínicas, sendo assim, não existe um tratamento único que funcione em todos os pacientes (Moreno et al., 2004). O Li é a mais de 60 anos o fármaco padrão ouro para o tratamento deste transtorno. Este fármaco possui efeitos sobre os episódios maníacos e apresenta um efeito modesto sobre a depressão (Geddes et al., 2004). Alguns mecanismos de ação do Li envolvem a inibição da PKC e consequente diminuição da liberação de neurotransmissores (Cechinel-Recco et al., 2012) e a modulação de enzimas antioxidantes, combatendo o estresse oxidativo percebido no TB (Jornada et al., 2011), trazendo uma melhora a nível comportamental (Valvassori et al., 2019).

A maioria das diretrizes recomenda a prescrição de Li para o tratamento do TB, contudo os médicos precisam prestar atenção ao seu perfil de segurança clínica (Young e Hammond, 2007). Este fármaco tem apresentado efeitos colaterais como o ganho de peso, a perda da libido, além da nefrotoxicidade, o que estimula os pacientes a interromperem o tratamento. De fato, monitorar os níveis de Li sérico é necessário para otimizar a eficácia do tratamento, bem como prevenir a toxicidade do Li. Pacientes com prescrição de Li pela primeira vez devem medir a litemia uma vez por semana até os níveis estabilizarem entre 0,6 e 0,8 mmol/l (Young e Hammond, 2007; Oliveira et al., 2010; McKnight, 2012). Entretanto, nem todos os pacientes aderem a monoterapia psicotrópica ou têm bons resultados, fazendo com que o tratamento seja feito com polifarmácia psicotrópica que aumenta os riscos de danos renais, sendo um dos principais perigos da polifarmácia (Nestsiarovich et al., 2019).

Os medicamentos utilizados na fase de mania aguda são Li, valproato, carbamazepina, antipsicóticos típicos (clorpromazina e haloperidol) e antipsicóticos atípicos (clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona e aripiprazole) (Goodwin e Consensus Group of the British Association for Psychopharmacology, 2003; Lloyd et al., 2003; Nestsiarovich et al., 2019). Esses tratamentos geram vantagens e desvantagens para seu usuário e devem ser avaliados individualmente (Geddes et al., 2000). Há dados de que o uso isolado do Li, valproato e carbamazepina, mesmo que funcione possui resultados lentos, o que não é desejável em pacientes com mania aguda. Assim, há indícios de que o uso de antipsicóticos é uma boa escolha nesses casos (Belmaker, 2004). Porém, o Li, desde a sua descoberta em um estudo clínico por Mogens Schou, em 1954, ainda é o único fármaco eficaz no controle da mania, especialmente na proteção da mania aguda e ainda reduz o risco de suicídio (Schou et al., 1954; Cipriani et al., 2005; Bech, 2006; Ohgami et al., 2009; Sarai et al., 2018). Contudo, pacientes que utilizam Li como tratamento podem sofrer uma disfunção tubular e glomerular, que é refletida pela perda da capacidade de filtração renal, que culmina com a doença renal crônica, que pode ser classificada em leve ou grave. Cerca de 50% dos pacientes que tomam Li diminuem sua concentração urinária (Turan et al., 2002). O mecanismo de ação do valproato é potencializar a função gabaérgica, aumentando a liberação do ácido gama-aminobutírico, principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) e, ainda, diminuir a catabolização deste

neurotransmissor (McElroy e Keck, 2000). A carbamazepina é um fármaco anticonvulsivante, seu mecanismo de ação é agir sobre os canais iônicos neuronais, com o bloqueio de canais de sódio, o que pode reduzir a excitabilidade neuronal (Zarate e Tohen, 2000).

Um dos problemas do tratamento da depressão bipolar é a possibilidade dos antidepressivos tricíclicos em induzir a virada maníaca nos pacientes (Sachs et al., 1994; Peet, 1994), principalmente aos pacientes que tiveram histórico de episódio maníaco severo que comprometera a sua integridade física e/ou a de terceiros (Belmaker, 2004). Entretanto, a fase de depressão no transtorno bipolar geralmente apresenta boa resposta ao tratamento com antidepressivos (Gijnsman et al., 2004). Pode ser prudente utilizar um inibidor seletivo da recaptação da serotonina (ISRS) como a FLX ou um inibidor da monoaminoxidase (IMAO) em vez de um antidepressivo tricíclico como tratamento de primeira linha (Gijnsman et al., 2004).

Diversos estudos clínicos têm demonstrado que o TMX, um antagonista de receptor de estrogênio, o qual é amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama, foi eficaz também para o tratamento da mania aguda em pacientes bipolares (Zarate et al., 2007; Yildiz et al., 2008; Yildiz et al., 2011). Além da inibição de estrogênio, outro mecanismo de ação do TMX é a inibição da atividade da PKC. Sendo assim, com base nessas observações, a inibição da PKC foi fundamentada como um mecanismo terapêutico promissor para o tratamento do TB (Zarate e Manji, 2009; Saxena et al., 2018).

1.3 O ESTRESSE OXIDATIVO NO TRANSTORNO BIPOLAR

Evidências, tanto clínicas quanto pré-clínicas, têm fortemente sugerido o envolvimento do estresse oxidativo no TB (Frey et al., 2006a; Halliwell, 2006; Andrezza et al., 2009; Berk et al., 2011; Jornada et al., 2011; Özerdem et al., 2016; Sigitova et al., 2017; Valvassori et al., 2019). A disfunção mitocondrial, com consequente prejuízo no metabolismo energético celular, tem sido descrita como principal desencadeadora desse sistema (Kato, 2007; 2016). Um estado energético celular atípico pode levar à perda da função e da plasticidade neuronal e, conseqüentemente, a alterações cognitivas e comportamentais características do TB (Steckert et al., 2010).

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

Em situações em que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade de defesa antioxidante, uma condição chamada de estresse oxidativo torna as biomoléculas vulneráveis a danos, podendo levar a apoptose (Cochrane, 1991; Sigitova et al., 2017). Entre as EROs encontram-se: o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Yu, 1994; Halliwell e Gutteridge, 1990; Sigitova et al., 2017).

Algumas das EROs são radicais livres, enquanto outras são agentes oxidantes não radicalares, como por exemplo o H_2O_2 . Dentre as EROs, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} são classificados como radicais livres de oxigênio porque apresentam um elétron desemparelhado em sua estrutura atômica. Os radicais livres, por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, são as espécies mais reativas (Halliwell e Gutteridge, 1989; McMurray et al., 2016). O radical OH^{\cdot} é a ERO mais potente e, conseqüentemente, é o que causa maior dano nos sistemas biológicos, devido ao seu tempo de vida extremamente curto (1×10^{-9} s) e de sua alta reatividade com uma grande variedade de moléculas orgânicas (Yu, 1994; McMurray et al., 2016). Além de ser produzido durante a fosforilação oxidativa, o radical OH^{\cdot} pode, ainda, ser formado por duas diferentes vias alternativas em organismos vivos: pela reação de Fenton e pela reação de Haber-Weiss (Haber e Weiss, 1934; Halliwell e Gutteridge, 1990; Galano et al., 2015).

Como proteção contra os efeitos deletérios das EROs, a célula possui algumas defesas antioxidantes capazes de atuar sobre essas substâncias tóxicas. Este sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não e ambos trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das EROs nos tecidos. O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a

GPx, a glutationa (GSH), a GR e a glutationa transferase (GT) (Chance et al., 1979; Yu, 1994; Huber et al., 2008). A SOD converte $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , o qual é subsequentemente reduzido a H_2O pela CAT. A GPx também converte H_2O_2 a H_2O , oxidando a GSH ao seu correspondente GSS. A GSH é regenerada pela GR por intermédio da oxidação de NADPH (Imai e Nakagawa, 2003; McMurray et al., 2016; Sigitova et al., 2017).

As EROs são citotóxicas e podem também ser originadas por meio de reações enzimáticas, de reações de auto oxidação ou, ainda, pelo grupo heme de algumas proteínas. Cerca de 1-2% do oxigênio consumido durante a fosforilação oxidativa é convertido em $O_2^{\cdot-}$, quando elétrons são liberados da cadeia de transporte de elétrons e são acidentalmente transferidos para o oxigênio molecular (Orrenius et al., 2007). No entanto, sob condições metabólicas ou de estresse específicos, uma quantidade ainda maior de elétrons podem ser liberados da cadeia respiratória, aumentando ainda mais a geração de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial. Esta liberação acidental de elétrons ocorre nos complexos I, II ou III, embora os complexo I e III sejam os maiores sítios de produção de $O_2^{\cdot-}$ dentro da mitocôndria (Orrenius et al., 2007; Koopman et al., 2010).

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

Marcadores de estresse oxidativo têm sido amplamente utilizados para o estudo do papel desse sistema nos transtornos psiquiátricos, como por exemplo: quantificação de hidroperóxidos de lipídeo, níveis de malondialdeído, de 4-HNE, de 8-ISO, de proteínas carboniladas e de 3-NITRO (Andreazza et al., 2009; 2013; Gubert et al., 2013). Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído e o 4-HNE (Halliwell, 2001). Dentre os isoprostanos, o 8-ISO é um composto do tipo prostaglandina, da família F2-isoprostanos, e também é

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

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

1.4 PROTEÍNA QUINASE C E TRANSTORNO BIPOLAR

Estudos recentes têm apontado para a neuroinflamação, estresse oxidativo, fatores neurotróficos e disfunção em organelas celulares como mediadores chave na fisiopatologia dos transtornos de humor, incluindo o TB (Berk et al., 2011; Machado-Vieira et al., 2014; Kirlioglu et al., 2019). Vários estudos clínicos e pré-clínicos sugeriram que a PKC desempenha um papel importante na fisiopatologia do TB (Zarate e Manji, 2009; Cechinel-Recco et al., 2012; Steckert et al., 2012; Saxena et al., 2018). A atividade aumentada de PKC também está associada a doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer (Newton, 2018).

A PKC orchestra mecanismos de sinalização neuronal de curto prazo (liberação de neurotransmissores e fluxos iônicos), a médio prazo (regulação de receptores), e a longo prazo (proliferação celular, remodelação sináptica e expressão gênica) (Amadio et al., 2006). No SNC, as enzimas da subfamília cPKC, PKC α , - β e - γ , são mais abundantemente expressas (Turner et al., 1984).

A família de proteínas da proteína quinase é uma das maiores superfamílias com cerca de 500 proteínas que são evolutivamente conservadas em 11 espécies eucarióticas e regulam vários eventos celulares (Kazi et al., 2008; Kabir e Kazi, 2011). A família PKC inclui 10 proteínas quinases serina e treonina

que são codificadas por 9 genes de mamíferos e reversivelmente fosforila resíduos de serina, treonina e tirosina nas proteínas alvo (Kazi et al., 2008). Estas 10 quinases são subdivididas em 3 subfamílias com base em sua estrutura e seus cofatores reguladores, ou seja, PKC clássica ou convencional [cPKC: α , β I, β II, e γ ; regulada por fosfolipídios, íons Ca^{2+} e diacilglicerol (DAG)], nova PKC (nPKC: ϵ , δ , η , θ , e μ ; regulada por fosfolipídio e DAG) e PKC atípica (aPKC: ξ , $\text{M}\xi$, ι e λ ; reguladas por fosfolipídeos, mas são independentes dos íons Ca^{2+} e DAG) (Sanchez-Bautista e Nicolas, 2013). Todas as PKCs consistem de um domínio catalítico C-terminal altamente conservado e um domínio regulatório N-terminal não conservado (Ohno e Nishizuka, 2002).

Isoenzimas PKC são altamente expressas nas estruturas frontolímbicas como córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e amígdala, que estão envolvidos na regulação do humor (Wetsel et al., 1992; Naik et al., 2000). PKC pode ser inibida por estabilizadores de humor, como Li e valproato (Zarate e Manji, 2009). Além disso, a sinalização de PKC está envolvida na regulação de processos que são afetados no TB, como a excitabilidade neuronal (Pahl et al., 2014), liberação de neurotransmissores (Zarate et al., 2006; Opazo et al., 2010), neurotransmissão glutamatérgica (Zarate et al., 2003), neuroplasticidade (Chu et al., 2014), ativação da via apoptótica (Nam et al., 2015), disfunção mitocondrial, estresse oxidativo (Hadley et al., 2014) e neuroinflamação (Jun et al., 2014; Suganthy et al., 2016; Kirlioglu et al., 2019).

De fato, a PKC esta implicada na regulação de sistemas envolvidos na modulação do humor, incluindo a excitabilidade neuronal, liberação de neurotransmissores e alterações a longo prazo na expressão gênica e plasticidade (DiazGranados e Zarate, 2008). Dentre os sistemas de neurotransmissão modulados por essa proteína, está amplamente descrito na literatura a importância da PKC sobre a sinalização dopaminérgica, modulando os processos de internalização, transporte e reciclagem desse neurotransmissor. A PKC age, principalmente, inibindo a atividade e expressão dos receptores de dopamina, conseqüentemente, aumentando sua atividade na fenda sináptica (Robinson, 2002; Melikian, 2004; Nissen-Meyer e Chaudhry, 2013).

O abuso de m-AMPH, um estimulante do tipo anfetamina, tem demonstrado estar associado a neuropsicotoxicidade, incluindo prejuízo da memória, morbidade psiquiátrica e toxicidade dopaminérgica. Evidências

convincentes de estudos pré-clínicos indicaram que a PKC desempenha um papel importante na neuropsicotoxicidade induzida por m-amph. A fosforilação do transportador de dopamina (DAT) mediada por PKC foi identificada como um dos pré-requisitos para a liberação de dopamina na fenda sináptica induzida por m-amph. Consistentemente, foi demonstrado que a PKC está envolvida em comportamentos maníacos, prejuízos na memória, induzidos por m-amph ou anfetamina, bem como a dependência destas drogas. A regulação direta ou indireta de fatores relacionados à plasticidade neuronal pareceu ser crítica para essas ações da PKC. Além disso, foi sugerido que a disfunção mitocondrial mediada por PKC, estresse oxidativo, sistema de defesa antioxidante prejudicado, desempenham um papel importante nos distúrbios psiquiátricos e cognitivos induzidos por m-amph ou anfetamina. Na toxicidade dopaminérgica induzida pela m-amph, particularmente a PKC δ demonstrou desencadear estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, alterações pró-apoptóticas e neuroinflamação. É importante ressaltar que PKC δ pode ser um mediador chave na retroalimentação positiva composta por esses eventos prejudiciais, potencializando a toxicidade dopaminérgica induzida por m-amph (Shin et al., 2019).

A ideação e o comportamento suicida são ocorrências comuns em pacientes com TB e a PKC também está envolvida nestas ocorrências (Simon et al., 2007a; Perlis et al., 2010). Em uma meta-análise com 8.700 pacientes, tanto a depressão unipolar como a depressão bipolar foram associadas com ideação e comportamento suicida e lócus gênico da PKC ϵ (Perlis et al., 2010).

Além disso, o substrato quinase C rico em alanina miristoilado (MARCKS), um substrato de PKC (Pandey et al., 2002), foi identificado como sendo um dos seis biomarcadores periféricos preditores de hospitalização passada e futura, em relação as tentativas de suicídio de pacientes com TB (Le-Niculescu et al., 2013).

A ativação de PKC mostrou diminuir drasticamente a atividade do DAT e aumentar a sua fosforilação (Robinson, 2002). Vários grupos de pesquisa relataram efeitos semelhantes de PKC sobre a atividade do DAT e forneceram evidências convincentes de que este efeito está associado à internalização do transportador em diferentes sistemas celulares (Zhu et al., 1997; Pristupa et al., 1998; Daniels e Amara, 1999; Melikian e Buckley, 1999). Atualmente, não há evidência direta de que a fosforilação do DAT seja necessária para essa

internalização. De fato, a mutação de todos os resíduos serina e treonina nas sequências consensuais clássicas da PKC não elimina a regulação ou internalização do DAT dependente de PKC, mas elimina a fosforilação dependente do DAT de PKC (Chang et al., 2001). Isso pode sugerir que a fosforilação direta do transportador não é necessária para o DAT internalizar e que uma proteína de andaimes pode ser o alvo da fosforilação (Torres et al., 2001). Ainda, observou-se que a ativação de um subtipo de receptor metabotrópico de glutamato resulta em uma inibição da atividade do DAT mediada por PKC (Page et al., 2001), fornecendo uma ligação funcional entre receptores de superfície celular e atividade do DAT.

Um grupo de pesquisa examinou o destino intracelular do DAT para determinar se é alvo de degradação ou fica disponível para reciclagem para a membrana plasmática. Em células com o DAT, a ativação de PKC diminuiu a atividade de transporte de dopamina em aproximadamente 30% em relação aos níveis do grupo controle e causou uma diminuição significativa na expressão da superfície celular do DAT marcado com proteína verde fluorescente (Daniels e Amara 1999). Este grupo utilizou várias estratégias para desenvolver evidências de que a diminuição da expressão da superfície celular está relacionada a uma aceleração da endocitose, em vez da desaceleração da redistribuição do transportador de um compartimento subcelular à superfície celular. A expressão de uma variante negativa dominante da dinamina 1 bloqueia a internalização do DAT dependente de PKC, sugerindo que a endocitose ocorre pela via da clatrina. Finalmente, desenvolveram-se evidências de que os transportadores internalizados são alvos de degradação lisossômica em vez de serem reciclados para a membrana plasmática (Daniels e Amara 1999).

Melikian e Buckley também examinaram os efeitos da ativação da PKC no DAT, mas concluíram que os transportadores poderiam ser reciclados para a membrana plasmática (Melikian e Buckley 1999). Como foi observado em outros sistemas celulares, a ativação da PKC causou diminuição dramática na atividade mediada por DAT e expressão de superfície celular. Usando técnicas de fracionamento subcelular e marcadores específicos de organelas, este grupo concluiu que o DAT é internalizado através de uma via endossomal e que a ativação da PKC aumenta a expressão do DAT em um compartimento de reciclagem endossômico. Estes estudos sugerem que o DAT internalizado é

reciclado de volta para a membrana plasmática neste sistema. Atualmente, parece possível que ambas as vias de internalização estejam disponíveis para DAT e esse contexto celular ou ativação basal de vias de sinalização podem influenciar o destino dos transportadores internalizados.

Juntos, esses achados suportam o papel da fosforilação do DAT na regulação das propriedades cinéticas do transportador mediadas pela ativação da PKC induzida por anfetaminas (Challasivakanaka et al., 2017).

1.5 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR M-AMPH

A uma enorme lacuna no conhecimento sobre a neurobiologia e funcionamento cerebral, associadas as limitações éticas e práticas em estudar o cérebro humano *in vivo* são os fatores que impedem o avanço no estudo sobre a neurobiologia e fisiopatologia dos transtornos de humor (Nestler e Hyman, 2010). Apesar do avanço tecnológico das técnicas de neuroimagem nos últimos anos, as técnicas não invasivas ainda não conseguem responder todas as perguntas sobre as disfunções do cérebro humano. Sendo assim, os modelos animais de transtornos psiquiátricos, mais especificamente os transtornos de humor, são uma importante ferramenta para o estudo da neurobiologia do TB (Valvassori et al., 2013a).

Ellenbroek e Cools (1990) propuseram que modelos animais válidos para os transtornos psiquiátricos devem demonstrar os três principais critérios a seguir: validade de face, validade de constructo e validade preditiva. A validade de face indica a habilidade do modelo em mimetizar os sintomas de determinada doença. A validade de constructo está relacionada com a habilidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos conhecidos da doença. Por último, a validade preditiva está relacionada com a habilidade do modelo em mimetizar o tratamento farmacológico do transtorno (Ellenbroek e Cools, 1990; Machado-Vieira et al., 2004; Nestler e Hyman, 2010; McGonigle e Ruggeri, 2013).

Os modelos animais focam na indução de comportamentos que mimetizam individualmente um episódio agudo de mania ou depressão. Esses modelos são de considerável valor e muitos deles possuem validade preditiva para identificar medicações com potencial antimaníaco ou antidepressivo (Duman e Monteggia, 2006; Einat e Manji, 2006; Einat et al., 2007).

O TB possui um curso clínico complexo com alternâncias de humor recorrentes entre episódios maníacos e depressivos, fazendo com que o desenvolvimento de um modelo animal seja desafiador. Até o presente momento, não existe nenhum modelo estabelecido que consiga mimetizar ambos os polos de humor no mesmo animal. Entretanto, o marco clínico para o TB é a presença de sintomas maníacos, nesse sentido os estudos pré-clínicos sobre a neurobiologia do TB utilizam modelos que reproduzem características de episódios maníacos, como a hiperatividade, a hipersexualidade, comportamentos de risco e a agressividade (Valvassori et al., 2017a).

Diversos estudos têm demonstrado que a administração de psicoestimulantes, especialmente as anfetaminas, é capaz de induzir hiperlocomoção em animais, além de diversos outros comportamentos do tipo maníaco como comportamento de risco, agressividade e hipersexualidade (Wang et al., 2013; Guarraci e Bolton, 2014; Zhou et al., 2015). O mesmo ocorre em humanos, as anfetaminas são capazes de produzir sintomas maníacos em controles saudáveis assim como induzir episódios maníacos em pacientes bipolares (Young e Macpherson, 2011).

Diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa, além de demonstrarem os comportamentos do tipo mania, induzidos por anfetamina, nos modelos animais, também demonstraram os efeitos do tratamento com Li e valproato, N-Acetilcisteína e deferoxamina, canabidiol (CBD), resveratrol *versus* estresse oxidativo (Frey et al., 2006a; Frey et al., 2006d; Frey et al., 2006e; Andreazza et al., 2008; Valvassori et al., 2008; Valvassori et al., 2011; da-Rosa et al., 2012a; Menegas et al., 2019); efeitos do tratamento com TMX *versus* PKC (Moretti et al., 2011; Cechinel-Recco et al., 2012; Steckert et al., 2012) e efeitos do tratamento com butirato de sódio *versus* histonas deacetilases (Arent et al., 2011; Moretti et al., 2011; Steckert et al., 2013; Valvassori et al., 2013b); só para citar alguns dos trabalhos.

As drogas análogas as anfetaminas são estimulantes do SNC e agem aumentando a liberação de dopamina e inibindo sua recaptção e degradação (Vasan e Olango, 2018). Uma vez que o aumento da atividade dopaminérgica é uma das principais hipóteses fisiopatológicas do TB (Joyce et al., 1995; Pantazopoulos et al., 2004; Vogel et al., 2004; Zhao et al., 2015), esse modelo apresenta validade de constructo. Sua validade preditiva é demonstrada através da

capacidade do modelo em responder aos estabilizadores de humor clássicos, como o Li e o valproato (Frey et al., 2006c).

A partir desses resultados começou-se a estudar a administração de anfetamina como modelo de mania, e observou-se que animais submetidos a esse protocolo apresentam hiperatividade locomotora, aumento na liberação de dopamina na fenda sináptica e essas alterações são revertidas após o tratamento com Li e valproato (Frey et al., 2006a). Não é necessário que o modelo animal desenvolva todos os sintomas do transtorno, já que os pacientes com o transtorno nem sempre manifestam todos os sintomas possíveis desse transtorno. O modelo animal de mania induzido por anfetamina possui dois protocolos, que são classificados devido à ordem de administração da droga e dos fármacos. Esses protocolos são denominados reversão e prevenção (Frey et al., 2006a).

Em um primeiro estudo do nosso grupo mostramos a eficácia dos dois protocolos. A administração de anfetamina foi capaz de causar hiperatividade locomotora nos animais, um parâmetro de comportamento do tipo maníaco, tanto no protocolo de reversão quanto no de prevenção. O tratamento com Li e valproato, fármacos classicamente utilizados na clínica, também foi capaz de prevenir e reverter esse aumento na atividade locomotora, contemplando as validades de face e preditiva de ambos os protocolos (Frey et al., 2006a).

Considerando a importância translacional em se pesquisar as bases neurobiológicas dos transtornos psiquiátricos, pois a pesquisa translacional oferece uma oportunidade para aplicar os achados da pesquisa pré-clínica na clínica cotidiana (Hallak et al., 2010), é importante investigar mecanismos que relacionem a PKC com o TB para buscar uma melhor compreensão da fisiopatologia deste transtorno.

1.6 JUSTIFICATIVA

É importante que alguns pontos sejam ressaltados: 1) o tratamento dos transtornos do humor não é totalmente eficaz; 2) a etiologia dos transtornos do humor parece envolver fatores genéticos e ambientais, apontando para o envolvimento das alterações na sinalização celular em sua fisiopatologia; e 3) os inibidores da PKC possuem um potencial promissor como moduladores do humor; entretanto, seus mecanismos de ação ainda não são completamente conhecidos.

Portanto, é de extrema importância conhecer as alterações induzidas pela m-AMPH no modelo animal de mania, afim de melhor descrever a fisiopatologia do TB, bem como novas possibilidades de abordagens terapêuticas para o mesmo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de isoformas da PKC como alvo para comportamentos do tipo maníaco e estresse oxidativo induzidos por metanfetamina em um modelo animal de mania.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos da administração ICV de iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ , TMX e Li sobre a atividade locomotora e exploratória, através do número de cruzamentos e de levantamentos no campo aberto, de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.
2. Avaliar os efeitos da administração ICV de iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ , TMX e Li sobre o comportamento de risco, através do número de visitas ao centro do campo aberto, de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.
3. Avaliar os efeitos da administração ICV de iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ , TMX e Li sobre o comportamento estereotípico, através da quantificação do tempo de limpeza das vibrissas e de auto-limpeza no campo aberto, de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.
4. Avaliar os efeitos da administração ICV de iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ , TMX e Li, sobre o dano oxidativo aos lipídeos, através da quantificação dos níveis de 4-HNE e de 8-ISO, no córtex frontal, no hipocampo e no estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.
5. Avaliar os efeitos da administração ICV de iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ , TMX e Li, sobre o dano oxidativo às proteínas, através da quantificação dos níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.
6. Avaliar os efeitos da administração ICV de iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ , TMX e Li, sobre o dano nitrosativo às proteínas, através da quantificação dos

níveis de 3-NITRO, no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por m- AMPH.

7. Avaliar os efeitos da administração ICV de iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ , TMX e Li, sobre a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m- AMPH.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados 120 ratos Wistar adultos machos, com 60 dias de idade, provenientes do biotério da UNESC. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e comida e com o ambiente mantido a temperatura de $23 \pm 1^{\circ}$ 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). Os protocolos foram iniciados somente após a aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UNESC sob o protocolo de número 007/2013.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

3.2.1 Procedimentos cirúrgicos

Nesse protocolo, os ratos Wistar machos foram anestesiados via intramuscular (i.m.) com cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) em uma proporção de 2:1, respectivamente, com um volume de 1ml/kg. Em um aparelho estereotáxico, uma cânula foi implantada no ventrículo lateral, através dos seguintes procedimentos: a pele do crânio dos animais foi removida e, através de um orifício de 2mm de diâmetro no crânio do animal, uma cânula guia de calibre 27 e 9mm de comprimento foi implantada a 0.9mm posterior ao bregma, 1.5mm a direita da linha central e 2.6mm ventralmente em relação a superfície do crânio (1.0mm acima do ventrículo cerebral lateral). A cânula foi fixada com cimento acrílico dental e os animais permaneceram em repouso durante 3 dias sem serem manipulados. O procedimento cirúrgico está de acordo como descrito no atlas de Paxinos e Watson (1986).

3.2.2 Desenho experimental

Após o procedimento cirúrgico, os animais se recuperaram durante três

dias. Após a recuperação cirúrgica, foi administrado via ICV os inibidores de PKC (iPKC): iPKC α , iPKC γ , iPKC ϵ . Além disso, também foram administrados via ICV o TMX e o Li, que também inibem PKC; entretanto, inibem PKC total.

A concentração das substâncias administradas via ICV foram: TMX 10^{-6} M (Nabha et al., 2005); Li $5\mu\text{M}/5\mu\text{L}$ (Zhang et al., 1997); peptídeo inibidor da PKC α , sc-3094 (C2-4 fornecido por Santa Cruz Biotechnology) $10\mu\text{M}/5\mu\text{L}$ (Gayen et al., 2009); chelerythrine chloride (fornecido pela Abcam), iPKC γ na dose de $20\text{ nmol}/5\mu\text{L}$ (Hsieh et al., 2009), peptídeo inibidor PKC ϵ , sc-3095 (fornecido por Santa Cruz Biotechnology), na dose de $10\mu\text{M}/5\mu\text{L}$ (Gayen et al., 2009) ou $5\mu\text{l}$ de líquido cefaloraquidiano artificial (LCRa) para o grupo controle. Todas as substâncias administradas via ICV foram injetadas durante 3 minutos para que não houvesse efluxo da substância. Imediatamente após a administração ICV dos inibidores os animais receberam salina (Sal - $1\text{mL}/\text{kg}$) ou m-AMPH ($2\text{mg}/\text{kg}$) via intraperitoneal (i.p.), para mimetizar um episódio de mania aguda. Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto 2 horas após a administração de Sal ou m-AMPH. Os grupos experimentais do presente estudo foram: 1) LCRa +Sal; 2) TMX+Sal; 3) Li+Sal; 4) iPKC α +Sal; 5) iPKC γ +Sal; 6) iPKC ϵ +Sal; 7) LCRa +m- AMPH; 8) TMX+ m- AMPH; 9) Li+ m- AMPH; 10) iPKC α + m- AMPH; 11) iPKC γ + m- AMPH; 12) iPKC ϵ + m- AMPH (**Tabela 1**).

O Li foi utilizado por ser um clássico e importante estabilizador de humor, considerado o padrão ouro no tratamento do TB (Valvassori et al., 2019). O TMX foi utilizado pela sua atividade inibitória sobre a PKC total (Einat et al., 2007). Além disso, estudos demonstraram a eficácia do TMX em episódios de mania aguda em pacientes bipolares (Bebchuk et al., 2000; Zarate et al., 2007; Yildiz et al., 2008; Yildiz et al., 2011). Quanto aos inibidores específicos da PKC, foram utilizados dois iPKC referentes à subfamília clássica (α e γ) e um referente à subfamília da PKC nova (ϵ).

Com este desenho experimental, a intenção dos pesquisadores foi verificar se alguma isoforma específica de PKC está envolvida nos efeitos antimaníacos de Li e de TMX.

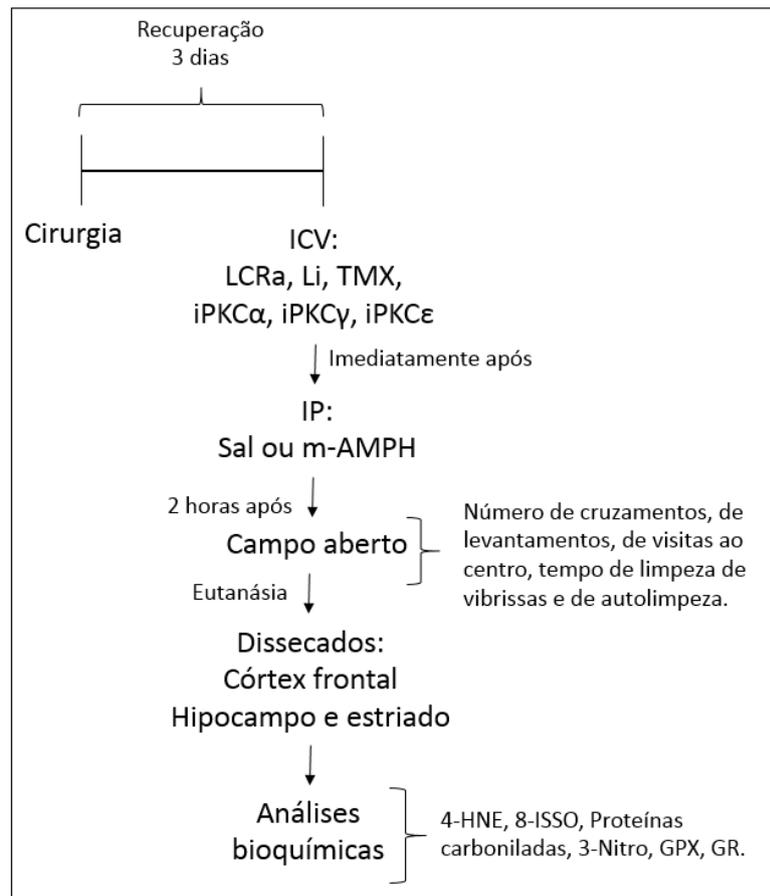


Tabela 1: Desenho experimental. LCRa: líquido céfalo-raquidiano artificial; Li: lítio; TMX: tamoxifeno; iPKC: inibidor da proteína quinase C; Sal: salina; m-AMPH: meta-anfetamina; 4-HNE: 4-hidroxinonal; 8-ISO: 8-isoprostano; 3-NITRO: 3-nitrotirosina; GPx: glutathiona peroxidase, GR: glutathiona redutase.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Teste do campo aberto

Este teste consiste em uma caixa de 40 x 60 cm para ratos, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada branca, com uma parede de vidro frontal e assoalho dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para explorar livremente a arena durante cinco minutos. A atividade locomotora foi avaliada contando, com ajuda de contadores, o número de cruzamentos feitos pelo animal entre as linhas pretas do campo aberto. A atividade exploratória foi avaliada

contando a quantidade de levantamentos quando os animais ficavam apoiados nas patas traseiras. Para a avaliação de comportamento de risco, foram contados o número de visitas ao centro do campo aberto. Para a avaliação do comportamento estereotípico foram cronometrados: o tempo que o animal ficou limpando as vibrissas e o tempo de auto-limpeza (Valvassori et al., 2017a).

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Imediatamente após o teste de campo aberto, os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação e o cérebro dissecado em córtex frontal, hipocampo e estriado. As amostras de tecido cerebral foram acondicionadas em microtubos, identificados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Logo após, as amostras foram armazenadas a -80 °C para posterior análise bioquímica.

3.5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÉREBRO DE RATOS

3.5.1 Medidas de peroxidação lipídica

Foram feitas duas medidas de peroxidação lipídica: 4-HNE (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, EUA; STA-338) e 8-ISO (Cayman, Item N ° 516351), através de kit para ELISA, seguindo o manual de instruções do fabricante.

No ensaio para a dosagem dos níveis de 4-HNE, um conjugado de HNE é revestido em uma placa de ELISA. As amostras ou os padrões de HNE foram adicionados à placa de ELISA. Depois de uma breve incubação, foi adicionado um anticorpo policlonal anti-HNE, seguido por um anticorpo secundário conjugado. A quantidade de adutos proteicos HNE nas amostras foi determinado por comparação com uma curva padrão HNE (Kimura et al., 2005). Os níveis de 4-HNE foram quantificados em µg/mL.

8-ISO foi quantificado usando um kit para ELISA do tipo competitivo. Este teste é baseado na competição entre 8-ISO (analito) e 8-ISO-acetilcolinesterase (8-ISO-AChE) conjugado (analito marcado), por um número limitado de sítios de união (antissoro específico para 8-ISO). Como o 8-ISO e o 8-ISO-AChE competem por um número limitado de ligação ao antissoro, a intensidade da cor induzida pela ligação

do analito marcado é inversamente proporcional à quantidade de 8-ISO. Por isso, foi realizado um ajuste da curva através de um modelo logístico de quatro parâmetros para a determinação da concentração real de 8-ISO. O 8-ISO foi quantificado em $\mu\text{g/ml}$.

3.5.2 Medidas de oxidação e de nitração de proteínas

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

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

3.5.3 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da GPx foi medida por meio de um kit específico, conforme as instruções da empresa fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). A forma oxidada da glutathiona é gerada através da redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada pela GPx, enquanto que a forma oxidada pode ser novamente convertida para o seu estado reduzido em uma reação catalisada pela enzima GR, a qual utiliza o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato (NADP^+) como coenzima. A oxidação do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzido (NADPH) para NADP^+ é seguida por uma diminuição na absorbância da luz, em um comprimento de onda $\lambda = 340 \text{ nm}$. Uma unidade de GPx é definida como a quantidade de enzima que provoca a oxidação de 1,0 nmol de NADPH a NADP^+ por minuto a 25 °C. A atividade da GPX foi expressa como $\text{nmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

A atividade da GR foi medida utilizando-se um kit de ensaio fornecido por Cayman Chemical. Através deste kit, foi possível determinar a taxa de oxidação de NADPH em NADP⁺, o que é seguido por uma queda na absorvância a $\lambda = 340$ nm. Uma unidade de GR é definida como a quantidade de enzima que induz a oxidação de 1,0 nmol de NADPH a NADP⁺ por minuto a 25 °C. A atividade desta enzima foi expressa em $\text{nmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

3.5.4 Determinação de proteínas

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

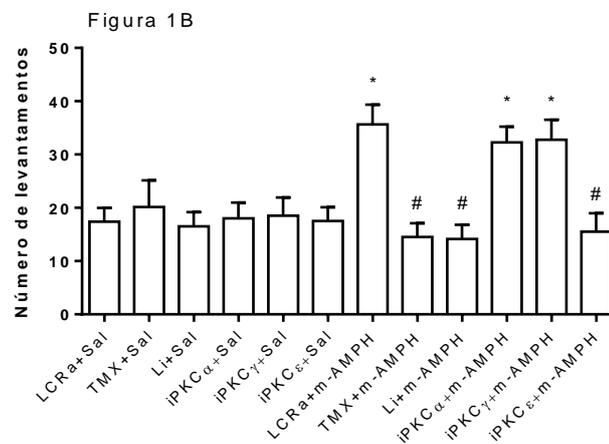
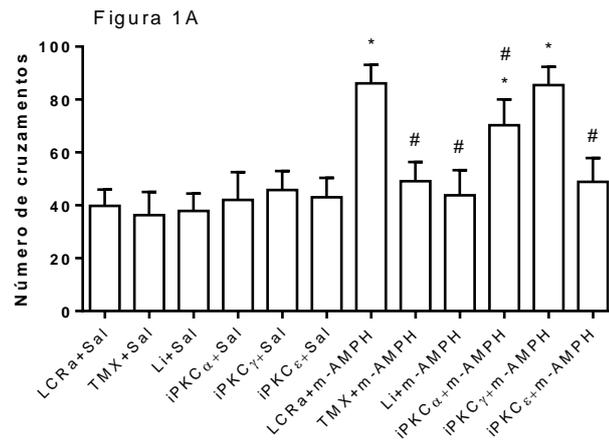
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados de comportamento e das atividades enzimáticas foram realizadas nos softwares SPSS 20 (IBM©) e STATISTICA 8 (Statsoft©). Teste de Shapiro-wilk foi realizado para avaliar se os resultados possuíam distribuição normal. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-hoc de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Os gráficos foram gerados no software Prism 6 (GraphPad©) e os dados estão apresentados em média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

A **Figura 1** demonstra os efeitos da administração ICV de Li, TMX, iPKC α , iPKC γ ou iPKC ϵ sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.

A administração de m- AMPH aumentou o número de cruzamentos (**Figura 1A**) e de levantamentos (**Figura 1B**) dos animais, quando comparado ao grupo controle, ou seja, induziu hiperatividade nos animais. A administração de TMX, de Li e de iPKC ϵ foi capaz de bloquear essas alterações comportamentais induzidas por m- AMPH. A injeção de iPKC α diminuiu, mas não bloqueou completamente, o aumento de cruzamentos induzidos por m- AMPH. A administração per se de Li, de TMX, de iPKC α , de iPKC γ e de iPKC ϵ não alterou a atividade locomotora e exploratória dos animais.



Figuras 1A e 1B. Efeitos do tamoxifeno (TMX), lítio (Li), inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , iPKC γ e iPKC ϵ sobre o número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta- Anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

A administração de m-AMPH aumentou o número de vezes que os animais visitaram o centro do campo aberto (**Figura 1C**), um comportamento considerado de risco. A administração de TMX, de Li ou de iPKC ϵ foi capaz de bloquear o comportamento de risco induzido por m-AMPH. A administração de iPKC α diminuiu, mas não bloqueou completamente, o comportamento de risco induzido por m-AMPH. A administração per se de Li, de TMX, de iPKC α , de iPKC γ e de iPKC ϵ não o número de vezes que o animal visitou o centro do campo aberto.

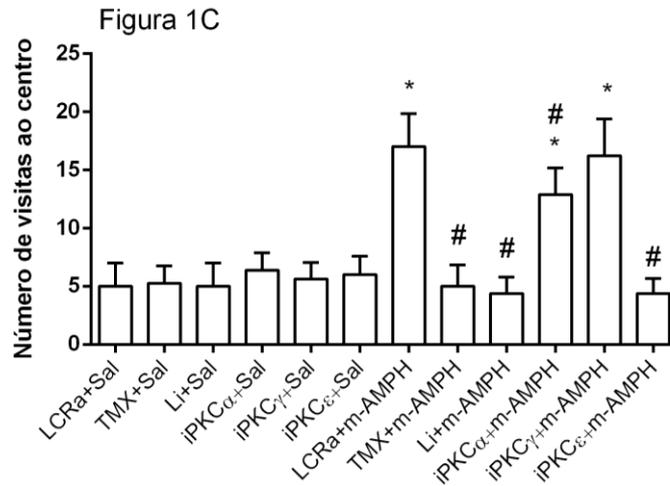
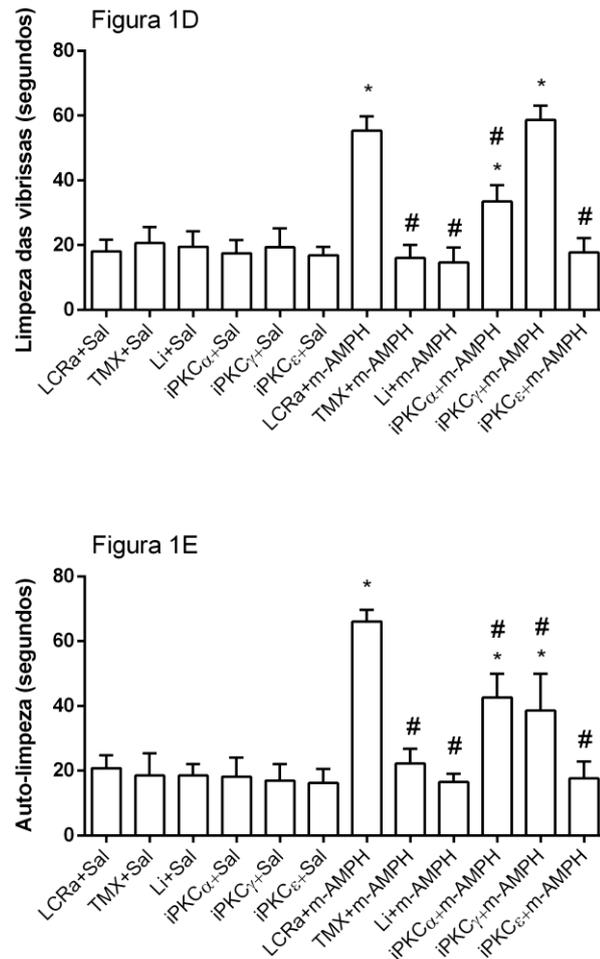


Figura 1C. Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre o número de visitas ao centro do campo aberto de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

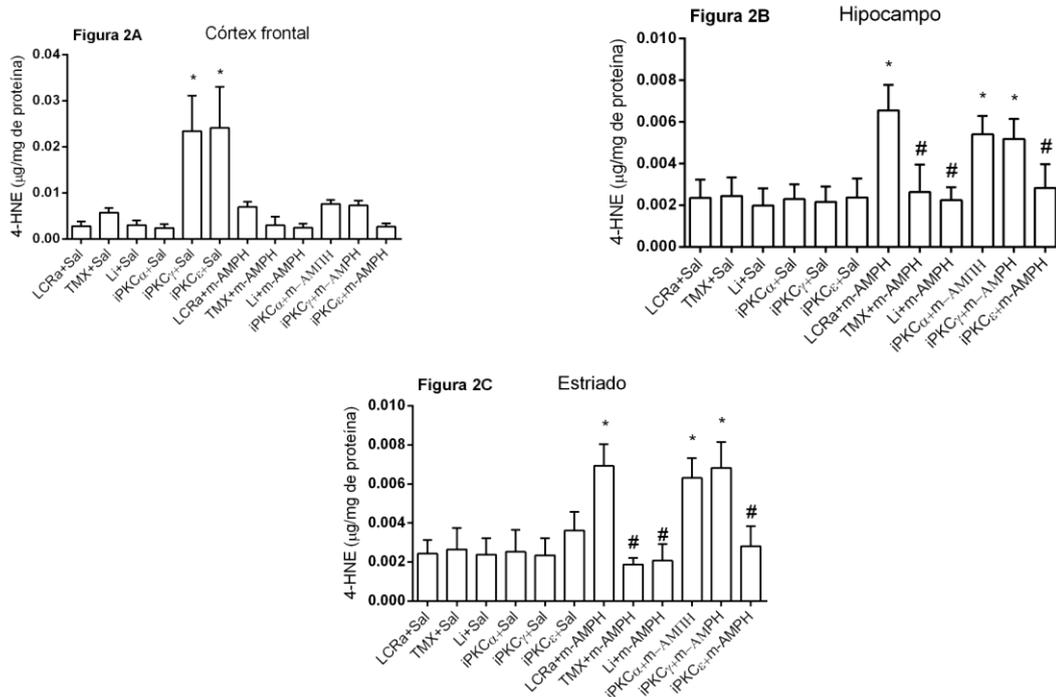
A administração de m-AMPH aumentou o tempo de limpeza das vibrissas (**Figura 1D**) e de auto-limpeza (**Figura 1E**) dos animais; ou seja, os animais apresentaram comportamentos estereotípicos. A administração de TMX, de Li, ou de iPKC ϵ foi capaz de bloquear os comportamentos estereotípicos induzidos por m-AMPH. A administração de iPKC α diminuiu ambos os comportamentos estereotípicos induzidos por m-amph; entretanto, o iPKC γ diminuiu somente o aumento de auto-limpeza induzido por m-AMPH. A administração per se de Li, de TMX, de iPKC α , de iPKC γ e de iPKC ϵ não alterou o tempo de limpeza das vibrissas nem de auto-limpeza dos animais.



Figuras 1D e 1E. Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre o número de limpeza das vibrissas (1D) e número de auto-limpeza (1E), no teste de campo aberto, de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

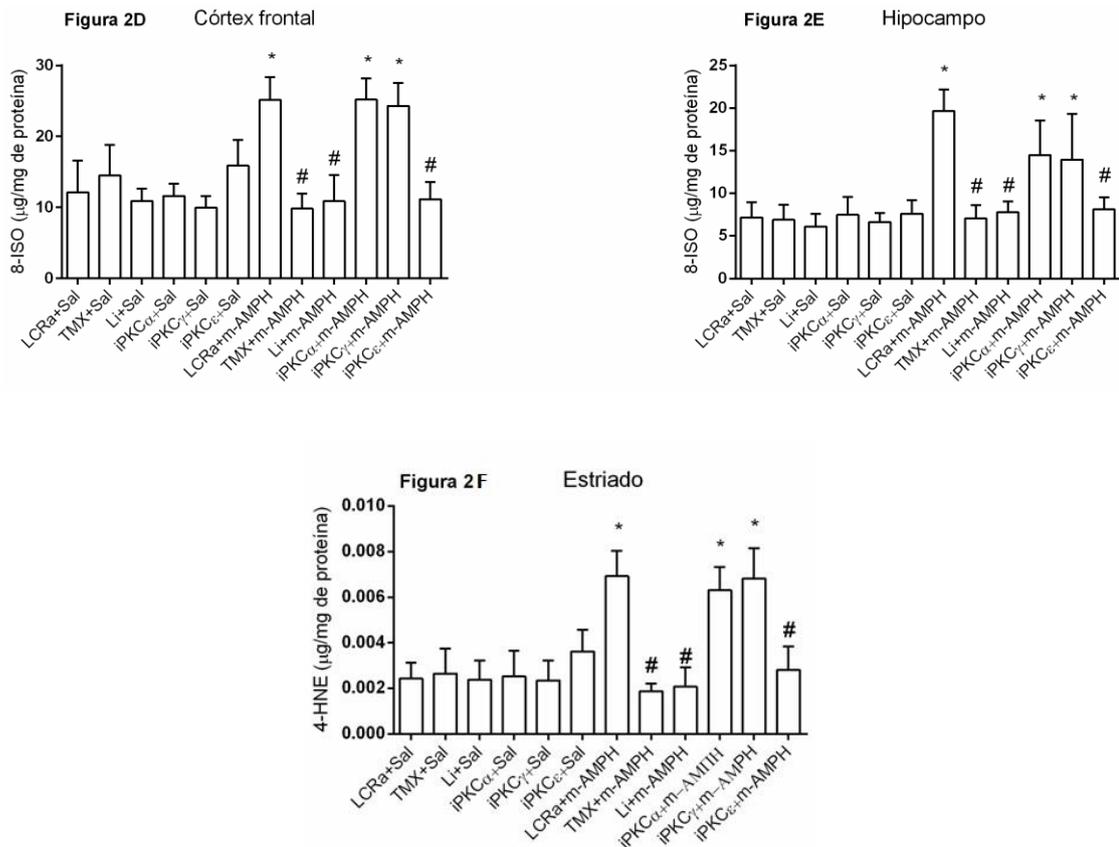
A **Figura 2** demonstra os efeitos da administração ICV de Li, TMX, iPKC α , iPKC γ , e iPKC ϵ sobre parâmetros de dano oxidativo aos lipídeos (4-HNE e 8-ISO) no córtex frontal, no hipocampo e no estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.

A administração de m-AMPH aumentou os níveis de 4-HNE no hipocampo (**Figura 2B**) e no estriado dos animais (**Figura 2C**); entretanto, m-AMPH não alterou os níveis de 4-HNE no córtex frontal (**Figura 2A**). A administração ICV de TMX, de Li e de iPKC ϵ foi capaz de bloquear o aumento dos níveis de 4-HNE induzido por m-AMPH. Entretanto, a administração de iPKC γ ou iPKC α por se aumentaram os níveis de 4-HNE no córtex frontal, quando comparado ao grupo controle.



Figuras 2A, 2B e 2C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de 4-hidroxinonena (4-HNE) no córtex frontal (2A), no hipocampo (2B) e no estriado (2C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

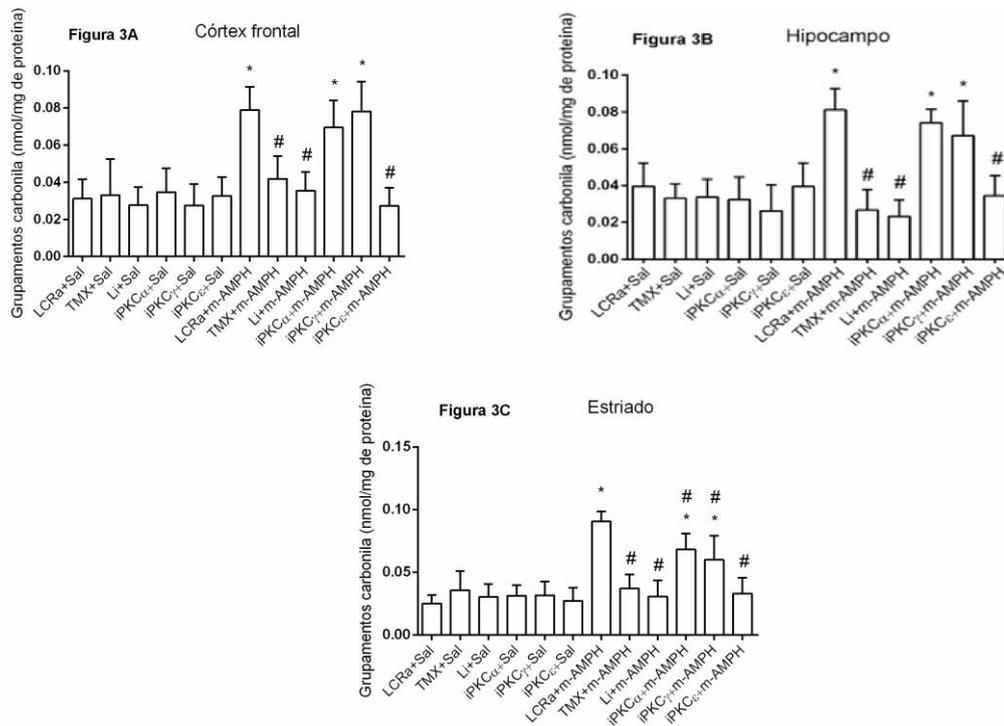
A administração de m-AMPH aumentou os níveis de 8-ISO no córtex frontal (**Figura 2D**), no hipocampo (**Figura 2E**) e no estriado (**Figura 2F**) dos ratos, quando comparado ao grupo controle. A administração ICV de TMX, de Li e de iPKC ϵ foi capaz de bloquear o aumento dos níveis de 8-ISO induzido por m-AMPH em todas as estruturas cerebrais avaliadas.



Figuras 2D, 2E e 2F: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de 8-isoprostano (8-ISO) no córtex frontal (2D), no hipocampo (2E) e no estriado (2F) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

A **Figura 3** demonstra os efeitos da administração ICV de Li, TMX, iPKC α , iPKC γ , e iPKC ϵ sobre parâmetros de dano oxidativo à proteína (proteínas carboniladas) no córtex frontal, no hipocampo e no estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.

A administração de m-AMPH aumentou os níveis de grupamentos carbonila em todas as estruturas no córtex frontal (**Figura 3A**), no hipocampo (**Figura 3B**) e no estriado (**Figura 3C**), quando comparado ao grupo controle. A administração de TMX, de Li ou de iPKC ϵ foi capaz de bloquear o dano oxidativo às proteínas induzido por m-AMPH em todas as estruturas cerebrais avaliadas. No estriado, a administração de iPKC α ou iPKC γ diminuiu, mas não bloqueou completamente, o dano oxidativo às proteínas induzido por m-AMPH.

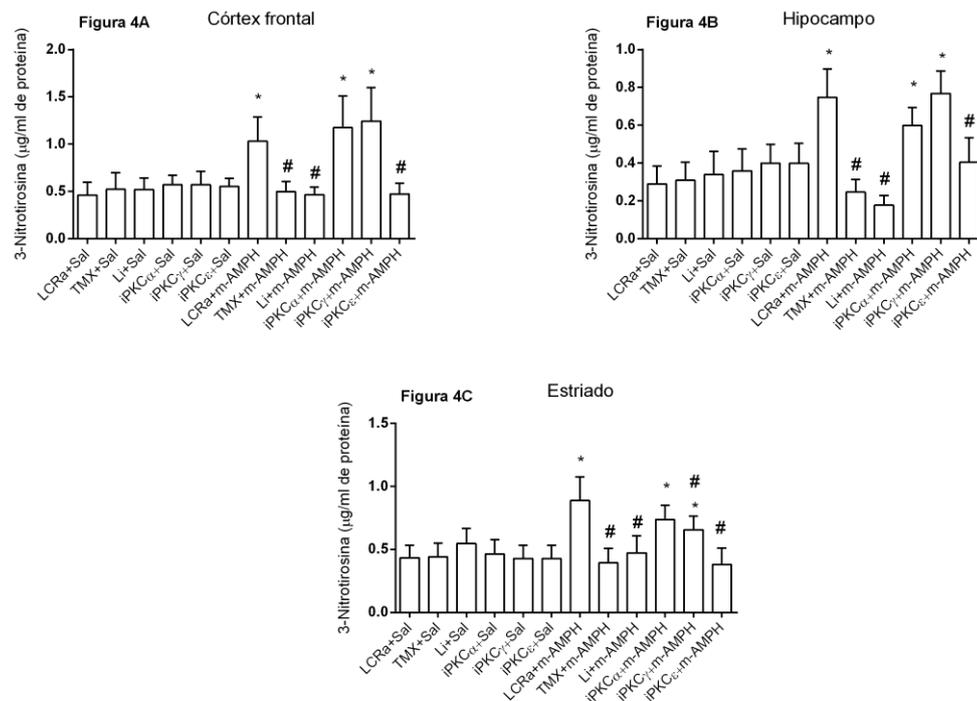


Figuras 3A, 3B e 3C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

A **Figura 4** demonstra os efeitos da administração ICV de Li, de TMX, de iPKC α , de iPKC γ , e de iPKC ϵ sobre parâmetros de dano nitrosativo à proteína (3-nitrotirosina) no córtex frontal, no hipocampo e no estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.

A administração de m-AMPH aumentou os níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal (**Figura 4A**), no hipocampo (**Figura 4B**) e no estriado (**Figura 4C**) dos ratos, quando comparado ao grupo controle. A administração ICV de TMX, de Li e de iPKC ϵ foi capaz de bloquear a nitração de proteínas induzida por m-AMPH em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Além disso, iPKC γ foi capaz de diminuir, mas não bloquear completamente, o aumento dos níveis de 3-nitrotirosina induzido A administração de m-AMPH aumentou os níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal (**Figura 4A**), no hipocampo (**Figura 4B**) e no estriado (**Figura 4C**) dos ratos, quando comparado ao grupo controle. A administração ICV de TMX, de Li e de iPKC ϵ foi capaz de bloquear a nitração de proteínas induzida por m-AMPH em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Além disso, iPKC γ foi capaz de diminuir, mas não

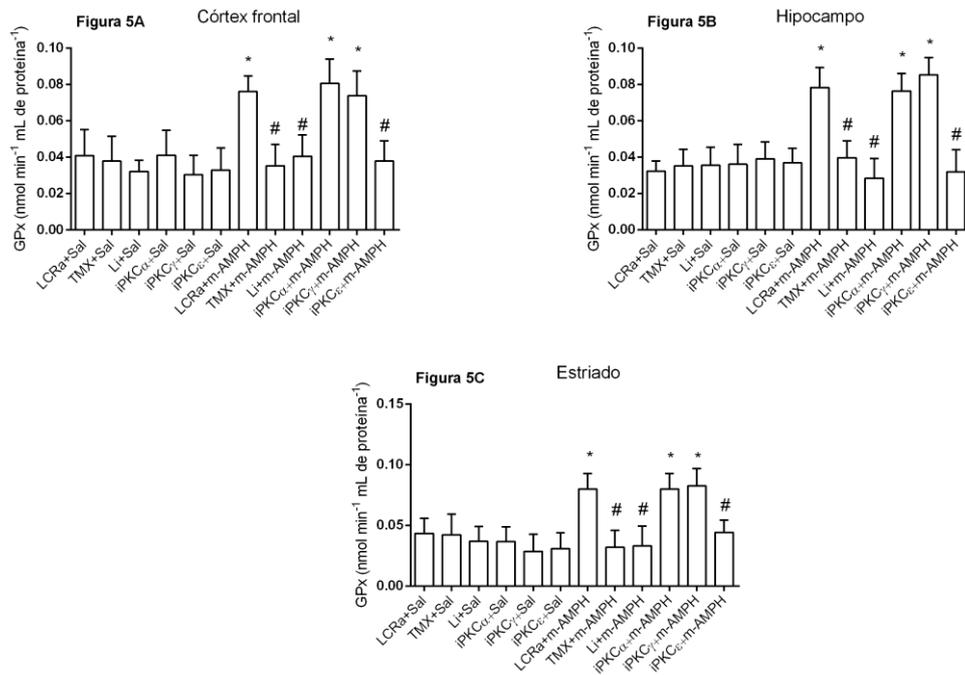
bloquear completamente, o aumento dos níveis de 3-nitrotirosina induzido por m-AMPH no estriado.



Figuras 4A, 4B e 4C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre os níveis de 3-nitrotirosina no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-AMPH. As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

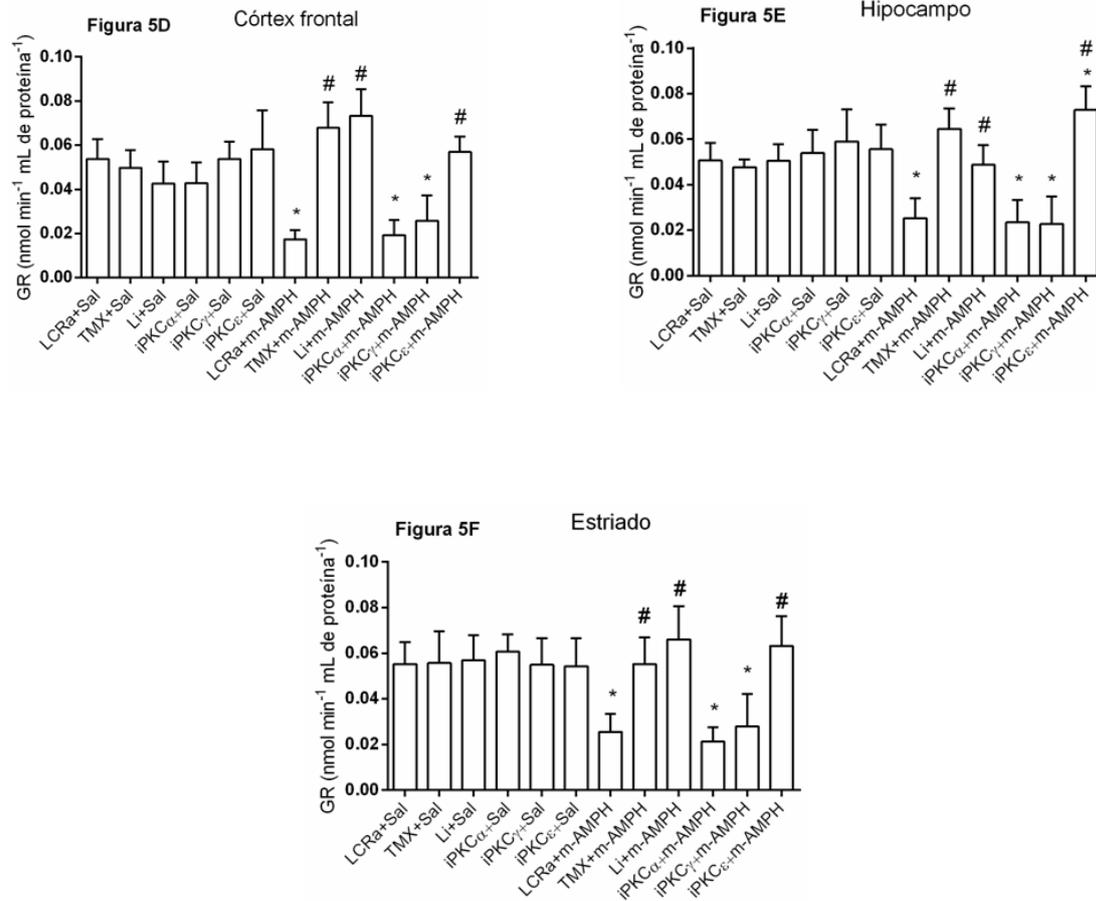
A **Figura 5** demonstra os efeitos da administração ICV de Li, de TMX, de iPKC α , de iPKC γ , e de iPKC ϵ sobre a atividade de enzimas antioxidantes (GPx e GR) no córtex frontal, no hipocampo e no estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por m-AMPH.

A administração de m-AMPH aumentou a atividade de GPx no córtex frontal (**Figura 5A**), no hipocampo (**Figura 5B**) e no estriado (**Figura 5C**) dos ratos, quando comparado ao grupo controle. A administração ICV de TMX, de Li e de PKC ϵ foi capaz de bloquear essa alteração enzimática induzida por m-AMPH em todas as estruturas cerebrais avaliadas.



Figuras 5A, 5B e 5C: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre a atividade de glutatona peroxidase (GPx) no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta-anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

A administração de m-AMPH diminuiu a atividade de GR no córtex frontal (**Figura 5D**), no hipocampo (**Figura 5E**) e no estriado (**Figura 5F**) dos ratos, quando comparado ao grupo controle. No córtex frontal, a administração ICV de TMX ou de iPKC ϵ foi capaz de bloquear a diminuição da atividade de GR induzida por m-AMPH. Nesta mesma estrutura cerebral, a administração de Li ICV concomitante à administração i.p de m-AMPH aumentou a atividade de GR, quando comparado com o grupo controle. No hipocampo, a administração cerebral de TMX ou Li bloquearam a diminuição de GR induzida por m-AMPH; já a administração de iPKC ϵ + m-AMPH aumentou a atividade de GR, quando comparado ao grupo controle. No estriado, a administração de Li, TMX e iPKC ϵ bloquearam a diminuição de GR induzida por m-AMPH.



Figuras 5D, 5E e 5F: Efeitos do tamoxifeno (TMX), do lítio (Li), do inibidor de proteína quinase C (iPKC) α , do iPKC γ e do iPKC ϵ sobre a atividade de glutatona redutase (GR) no córtex frontal (D), no hipocampo (E) e no estriado (F) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por meta- Anfetamina (m-AMPH). As barras representam média \pm erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ comparado com grupo LCRa+Sal; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo LCRa+m-AMPH, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo post-hoc de Tukey.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado utilizando-se córtex frontal, hipocampo e corpo estriado de ratos. Estas estruturas cerebrais foram selecionadas para as análises por estarem relacionadas ao raciocínio e o planejamento (córtex frontal), memória (hipocampo) e recompensa (estriado), bem como por serem afetadas em pacientes com transtornos de humor. Tendo-se em vista a importância do sistema límbico nos principais domínios comportamentais afetados por transtornos de humor, os mediadores biológicos desencadeados pela interação ambiente-gene têm sido sugeridos como fatores chave para a fisiopatologia dos transtornos de humor (Ludwig e Dwivedi, 2016; Hoffmann et al., 2017). Além disso, as isoformas da PKC são altamente expressas nas áreas cerebrais supracitadas, as quais apresentam vias dopaminérgicas que estão envolvidas na modulação das respostas comportamentais aos estímulos que ativam as sensações de recompensa através do neurotransmissor dopamina (Wetsel et al., 1992; Naik et al., 2000; Ludwig e Dwivedi, 2016; Hoffmann et al., 2017).

De forma geral, as anfetaminas agem no cérebro como ativadoras do sistema dopaminérgico, aumentando a liberação de dopamina e diminuindo a recaptção deste neurotransmissor (Perugi et al., 2017). Uma das proteínas envolvidas na oxidação e conseqüente inativação da dopamina é a monoamina oxidase (EC 1.4.3.4), uma enzima cuja atividade produz H_2O_2 no tecido cerebral, principalmente quando há acúmulo de monoaminas na fenda sináptica (Halliwell, 2001). A m-AMPH é um composto pertencente à classe das anfetaminas com pronunciada ação sobre o sistema dopaminérgico. O crescimento mundial no uso desta droga tem sido observado particularmente a partir da última década (*United Nations Office on Drugs and Crime*, 2017) e, portanto, o consumo de anfetaminas é um grave problema de saúde pública. Visto que a m-AMPH é estruturalmente semelhante à dopamina, ela é captada por neurônios dopaminérgicos tal como se fosse um substrato de DAT. Em altas concentrações, a m-AMPH pode cruzar a membrana de neurônios dopaminérgicos por difusão lenta, devido à sua alta lipossolubilidade (Saha et al., 2014). Nestas células, o psicoestimulante induz efluxo de dopamina mediado por DAT, contribuindo, assim, para um aumento nos níveis do neurotransmissor na fenda sináptica (Panenka et al., 2013; Sulzer et al., 2005).

Estudos têm sugerido que a administração aguda de anfetaminas pode induzir uma gama de comportamentos do tipo maníaco em roedores, sendo considerada um modelo animal de mania consistente, conforme já demonstrado em diversos trabalhos (Frey et al., 2006a; Frey et al., 2006d; Frey et al., 2006e; Andreazza et al., 2008; Valvassori et al., 2008; Arent et al., 2011; Moretti et al., 2011; Valvassori et al., 2011; da-Rosa et al., 2012a; Cechinel-Recco et al., 2012; Steckert et al., 2012; Steckert et al., 2013; Valvassori et al., 2013b; Zhou et al., 2015; Minassian et al., 2016; Saxena et al., 2018; Menegas et al., 2019). De fato, Einat e colegas (2007) demonstraram em testes comportamentais realizados em ratos que a administração aguda/crônica de anfetamina induz aumento na distância total percorrida (o que indica hiperlocomoção) e no número de visitas ao centro (o que é sugestivo de comportamento de risco). O tratamento com TMX mitigou estes comportamentos induzidos por anfetamina no teste de campo aberto, enquanto que não provocou efeito significativo nos ratos do grupo controle (Einat et al., 2007). Os efeitos comportamentais agudos decorrentes do uso de anfetaminas por pacientes podem ser detectáveis pela indução de episódios maníacos, os quais são caracterizados por aumento na “energia” e na atividade em geral (Darke et al., 2008; Cruickshank e Dyer, 2009; Pettorruso et al., 2014).

É bem descrito na literatura que o estresse oxidativo pode levar a distúrbios na sinalização mediada pela PKC. Por exemplo, há evidência de que esta proteína apresenta motivos que são particularmente suscetíveis a dano oxidativo, incluindo seu domínio regulatório (N-terminal), cuja peroxidação pode levar a uma atividade permanentemente aumentada da PKC (Gopalakrishna e Jaken, 2000). Além disso, a fosforilação do domínio N-terminal do transportador de dopamina induzida por m-AMPH contribui para a liberação deste neurotransmissor na fenda sináptica, ao passo que isoformas de PKC específicas foram implicadas no estresse oxidativo desencadeado pela citotoxicidade dopaminérgica provocada pela m-AMPH (Shin et al., 2019). Neste contexto, a atividade da PKC está sendo sondada como um importante alvo para a terapia do TB, principalmente devido à sua desregulação na fase maníaca do transtorno (Hoertel et al., 2013; Abrial et al., 2014; Saxena et al., 2018). Além do TMX, outros inibidores de PKC, tais como os flavonoides, estão sendo testados em cenários experimentais mimetizando o TB; muitos destes compostos apresentam perfil de atividade promissor para serem incluídos no arsenal terapêutico atual (Einat, 2014; Kanazawa et al., 2016; Kanazawa et al., 2017).

Adicionalmente, diversos estudos têm descrito o envolvimento do estresse oxidativo no TB (Frey et al., 2006a; Halliwell, 2006; Andreatza et al., 2009; Berk et al., 2011; Jornada et al., 2011; Özerdem et al., 2016; Sigitova et al., 2017; Valvassori et al., 2019). A disfunção mitocondrial, com conseqüente comprometimento no metabolismo energético celular, é considerada o principal evento desencadeador deste processo (Kato, 2007; 2016). Um estado energético celular atípico pode levar à perda da função e da plasticidade neuronal o que, por sua vez, pode culminar em alterações cognitivas e comportamentais que são características do TB (Steckert et al., 2010).

Na primeira etapa do presente estudo, foi conduzida uma análise comportamental. As atividades locomotora e exploratória, bem como os comportamentos de risco e estereotípico dos animais foram avaliados por meio do teste de campo aberto. O comportamento estereotípico ou estereotipia, que consiste em movimentos repetidos sem variações, é um parâmetro relacionado com a ativação progressiva de receptores dopaminérgicos. Por conseguinte, este comportamento pode ser induzido por vários fármacos com ação agonista dopaminérgica, incluindo a anfetamina, e pode ser identificado em roedores pela limpeza das vibrissas e por movimentos de auto-limpeza (Correia et al., 2008). O comportamento estereotípico também pode ocorrer em transtornos psiquiátricos, tais como o TB (Pettorruso et al., 2014). No presente estudo, a administração de m-AMPH induziu hiperatividade significativa, o que está em conformidade com a literatura (da-Rosa et al., 2012b; Feier et al., 2013). Em roedores, a hiperlocomoção mimetiza os episódios maníacos de pacientes bipolares (Nestler e Hyman, 2010). Neste sentido, o Li é comumente utilizado nos estudos sobre TB por ser um clássico e importante estabilizador de humor, considerado o padrão ouro no tratamento deste transtorno (Valvassori et al., 2019). O TMX foi utilizado em virtude de sua atividade inibitória da PKC total e por ter sido aprovado para uso humano como fármaco antiestrogênico (Einat et al., 2007). Além disso, estudos demonstraram a eficácia do tratamento com TMX para atenuação de episódios de mania em pacientes bipolares (Bebchuk et al., 2000; Zarate et al., 2007; Yildiz et al., 2008; Yildiz et al., 2011). Considerando-se as diferentes alterações comportamentais observadas, é possível afirmar que os inibidores de PKC apresentaram o seguinte perfil de “atividade preventiva”:

$$\text{TMX} \approx \text{Li} \approx \text{iPKC}\epsilon > \text{iPKC}\alpha > \text{iPKC}\gamma$$

(Ou seja: TMX, Li e iPKC ϵ apresentaram atividade similar sobre os parâmetros analisados; porém, a atividade de iPKC ϵ foi maior que a de iPKC α , a qual, por sua vez, foi maior que a de iPKC γ)

Portanto, dentre os inibidores específicos de PKC, o iPKC ϵ foi o mais eficaz, o que indica que a sinalização mediada pela isoforma ϵ pode ser crucial no mecanismo patológico subjacente às alterações comportamentais induzidas no modelo de mania. Curiosamente, um estudo realizado com camundongos nocautes para a isoforma ϵ (PKC $\epsilon^{-/-}$) demonstrou uma diminuição significativa no nível de comportamento do tipo ansioso e nos níveis séricos de hormônios liberados por estresse – um efeito que foi associado à modulação de receptores de ácido γ -aminobutírico do tipo A (Hodge et al., 2002). Além disso, uma metanálise de estudos de associação de genoma (GWAS, do inglês *genome-wide association studies*) relacionados a transtornos de humor *versus* risco de suicídio, abrangendo mais de 8700 pacientes, revelou uma correlação estatisticamente significativa entre o locus do gene codificante para a PKC ϵ e o risco de suicídio (Perlis et al., 2010). Ao menos em parte, as anormalidades na atividade da PKC ϵ poderiam estar envolvidas nos mecanismos patológicos subjacentes às alterações comportamentais em transtornos de humor como o TB, bem como na vulnerabilidade ao suicídio associada a estas condições psiquiátricas. Os achados do presente estudo também destacam a relevância da isoforma ϵ no modelo mimetizando a fase maníaca do TB.

O presente estudo demonstrou que a microinfusão de Li ou TMX preveniu o aumento em parâmetros de hiperlocomoção (número de levantamentos e o número de cruzamentos), de comportamento estereotípico (tempo de limpeza das vibrissas e a auto-limpeza) e de comportamento de risco (número de visitas ao centro), as quais foram alterações induzidas pela administração de m-AMPH. Em concordância com estes achados, estudos prévios utilizando o modelo animal de mania induzido por anfetamina, demonstraram notável atividade antimaníaca de Li e TMX (Valvassori et al., 2011; Cechinel-Recco et al., 2012; Feier et al., 2012; Feier et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que o TMX e a queleritrina (um inibidor da PKC) podem diminuir a hiperlocomoção e a frequência de visitas ao centro observadas em um modelo animal de mania induzido pelo isômero D da anfetamina (dextroanfetamina) (Abrial et al., 2013), enquanto que a hiperatividade induzida por esta substância foi

acompanhada por um aumento na atividade e fosforilação de PKC total em córtex frontal, hipocampo e corpo estriado de roedores (Cechinel-Recco et al., 2012). Portanto, é possível sugerir que os efeitos antimaníacos sobre o comportamento dos animais, promovidos pela administração ICV de Li ou TMX, estão associados à inibição da atividade da PKC. Esta hipótese parece relevante, em um cenário caracterizado pela busca incessante por um melhor entendimento sobre a etiologia e a fisiopatologia do TB.

A avaliação dos parâmetros de peroxidação lipídica revelou que a inibição de PKC γ ou PKC ϵ (mas não de PKC γ), *per se*, induziu um aumento significativo no conteúdo de 4-HNE no córtex frontal. Este achado pode ser considerado intrigante, uma vez que uma diminuição no conteúdo de PKC ϵ , acompanhada por um aumento nos níveis de 4-HNE, foi também relatada em ratos submetidos a um modelo de transtorno depressivo (estresse brando e imprevisível crônico) (Zhang et al., 2018). Em relação ao hipocampo e corpo estriado, a administração de TMX, Li ou iPKC ϵ preveniu o aumento nos níveis de 4-HNE induzido por m-AMPH. Um padrão de alteração similar foi detectado no conteúdo de 8-ISO em todas as estruturas cerebrais, nas quais estes três inibidores também impediram o dano lipídico oxidativo mediado pelo psicoestimulante. Neste sentido, foi demonstrado que os produtos de peroxidação lipídica, tais como o 4-HNE, induzem apoptose de forma dependente de dose, através de um mecanismo que envolve a ativação da via da c-Jun N-terminal cinase – uma via posicionada *downstream* à PKC (Kutuk e Basaga, 2007). Portanto, a hipótese de que os sinais moleculares desencadeados pela ligação dos inibidores de PKC se difundem intracelularmente não pode ser descartada, afetando vias que poderiam ser ativadas por produtos de peroxidação lipídica. O achado de que o estresse oxidativo relacionado ao envelhecimento ativa a PKC ϵ (Bailey et al., 2018) indica que as espécies reativas são parte de um círculo vicioso no qual estas entidades ora estimulam a isoforma ϵ , ora são geradas como consequência da ativação da PKC ϵ .

Os dados fornecidos pela análise dos parâmetros de oxidação de proteínas (conteúdo de grupamentos carbonila e 3-NT) demonstraram que a infusão prévia de TMX, Li ou iPKC ϵ induziu uma diminuição significativa nos níveis destes marcadores em todas as áreas cerebrais avaliadas. Diminuições “parciais” foram detectadas no corpo estriado, por meio do uso de iPKC α ou iPKC γ (conteúdo de grupamentos carbonila); e iPKC γ , apenas (3-NT). Novamente, a infusão de iPKC ϵ foi eficaz ao

prevenir alterações em todos os parâmetros e estruturas cerebrais. Neste contexto, foi demonstrado que a administração do isômero D da anfetamina (dextroanfetamina) induziu aumento no conteúdo de grupamentos carbonila ligadas a proteínas no córtex frontal, hipocampo e corpo estriado de ratos, ao passo que o pré-tratamento dos animais com TMX preveniu completamente o aumento no conteúdo de grupamentos carbonila induzido por dextroanfetamina no córtex frontal e parcialmente nas outras estruturas (Steckert et al., 2012). Tanto a administração deste isômero quanto a administração de m-AMPH (≤ 2 mg/kg de peso corporal) foram associadas a dano proteico oxidativo no córtex frontal, hipocampo e corpo estriado de ratos (da-Rosa et al., 2012a), o que está em conformidade com os achados do presente estudo. Foi também observado que o grau mais elevado de atividade preventiva dos inibidores de PKC foi detectado no corpo estriado. Este achado parece antagonizar evidências indicando que o corpo estriado é considerado o sítio primário a sofrer toxicidade dopaminérgica induzida por m-AMPH e seus análogos em cérebro de roedores (Shin et al., 2011; Nguyen et al., 2019). Desta maneira, teoricamente, esperar-se-ia que os compostos não pudessem neutralizar o excesso de espécies reativas induzidas pelo psicoestimulante em uma região particularmente sensível à citotoxicidade dopaminérgica, mas os dados da presente pesquisa demonstraram o oposto. É importante destacar que existem diferentes níveis de toxicidade entre as anfetaminas, de modo que a m-AMPH induz um dano oxidativo maior que a dextroanfetamina e este efeito varia conforme a área cerebral e o protocolo experimental utilizado, com as diferenças neuroquímicas subjacentes ainda pouco compreendidas (da-Rosa et al., 2012a).

Corroborando com os achados da presente pesquisa, vários estudos *post-mortem* têm demonstrado níveis elevados de grupamentos carbonila, 3-NT, 4-HNE e 8-ISO no córtex pré-frontal de pacientes bipolares (Wang et al., 2009; Andreatza et al., 2010; 2013). Outros estudos encontraram níveis elevados de malondialdeído e de grupamentos carbonila no sangue destes pacientes, quando comparados com controles saudáveis (Andreatza et al., 2009; Kapczinski et al., 2011; Pedrini et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que a administração de m-AMPH em um modelo animal de mania aumenta a oxidação lipídica e proteica, expressas como aumento no conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e de proteínas carboniladas (da-Rosa et al., 2012b). Resultados recentes também demonstraram alterações nos níveis de 4-HNE, conteúdo de grupamentos carbonila e 3-NT em um modelo animal

de mania induzido por este psicoestimulante (Menegas et al., 2019). Portanto, o estresse oxidativo desempenha um papel crucial nas alterações comportamentais induzidas por m-AMPH, conforme demonstrado por dados da literatura e pelos achados do presente estudo.

Os próximos parâmetros neuroquímicos avaliados foram as atividades das enzimas relacionadas à glutatona (GPx e GR). A GPx catalisa a oxidação da glutatona, ao passo que a GR catalisa a regeneração deste tripeptídeo à sua forma reduzida, na presença da coenzima dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato reduzido (NADPH) (Huber et al., 2008). Um aumento em GPx foi detectado nas estruturas cerebrais de animais rebendo apenas veículo (por via ICV) e m-AMPH (por via i. p.). A infusão de TMX, Li ou iPKC ϵ preveniu significativamente esta alteração. É importante frisar que as evidências sobre o efeito da m-AMPH na atividade da GPx ainda são escassas. A administração do psicoestimulante em estudos prévios induziu uma diminuição na atividade da GPx e GR em hipocampo de ratos (Taheri et al., 2018; Keshavarzi et al., 2019). Contudo, recomenda-se precaução ao se interpretar estes achados, uma vez que estes pesquisadores utilizaram regimes de administração diferentes daquele usado no presente trabalho. Além disso, Taheri et al. (2018) e Keshavarzi et al. (2019) utilizaram doses superiores de m-AMPH (10 mg/kg de peso corporal, uma vez ao dia), visando a mimetizar outras condições, diferentes de um episódio maníaco. Em outro estudo, a administração de anfetamina induziu diversas respostas sobre enzimas antioxidantes de rato, incluindo uma sobrerregulação de 127% em GPx em corpo estriado e uma redução de 35% na atividade da GR em córtex frontal, o que, ao menos em parte, está em concordância com os achados do presente estudo (Carvalho et al., 2001). A administração de m-AMPH em *binge* (4 x 20 mg/kg a cada 5 horas) foi também associada a um conteúdo significativamente reduzido do antioxidante glutatona em corpo estriado de rato (Moszczynska et al., 1998), ao passo que na dose de 10 mg/kg, este psicoestimulante induziu diminuição na atividade da GR em hipocampo de ratos (Rahimi Borumand et al., 2019). Uma vez que uma ativação anormal da PKC foi associada a aumentos na atividade da enzima NADPH oxidase (EC 1.6.3.1) e estresse oxidativo (Asano et al., 2012), é possível que o aumento na atividade da GPx ocorreu, em parte, para contrabalançar a geração de espécies reativas de oxigênio induzida por m-AMPH. Além disso, a atividade diminuída da GR em todas as estruturas cerebrais também colaborou,

potencialmente, para retardar a depuração de espécies reativas, por meio de um comprometimento na restauração da glutatona para sua forma reduzida. É importante ressaltar que Andreatta e colegas (2009) relataram um aumento nas atividades da GR e glutatona-S-transferase (EC 2.5.1.18) em sangue de pacientes bipolares em estágio tardio, o que indica que também pode haver aumento na atividade destas proteínas como uma forma de compensar o estresse oxidativo induzido cronicamente.

Assim, considerando-se os achados do presente estudo e a literatura atual, é plausível supor que a citotoxicidade dopaminérgica mediada por m-AMPH leve a um desequilíbrio na homeostase redox. Este desequilíbrio tornaria os neurônios propensos a dano oxidativo, com a liberação de biomarcadores de oxidação de lipídeos e proteínas, comprometendo a função de enzimas relacionadas à glutatona e outras macromoléculas biológicas e, finalmente, aumentando a probabilidade dos neurônios à apoptose. De fato, estudos têm demonstrado alterações que são consistentes com a deflagração da apoptose em células ou estruturas cerebrais de pacientes bipolares (Uribe e Wix, 2012; Schroeder et al., 2016; Scaini et al., 2017). Uma vez que as isoformas de PKC parecem desempenhar um papel central nestes distúrbios oxidativos, no presente estudo, a inibição da PKC (especialmente a isoforma ϵ) impediu estes defeitos decorrentes do desequilíbrio na homeostase redox, apesar das diferenças na atividade das isoformas entre as estruturas cerebrais.

De fato, no presente estudo, a administração do inibidor específico da isoforma PKC ϵ reduziu as alterações comportamentais promovidas pela m-AMPH, indicando que este composto apresenta atividade antimaníaca. Neste contexto, vários estudos mostraram que polimorfismos de nucleotídeos únicos no gene *PDLIM5*, codificando de uma proteína que é alvo da PKC ϵ (proteína 5 de domínios PDZ e LIM), estão associados ao TB (Kato et al., 2005; Shi et al., 2008; Squassina et al., 2008). Em estudos *post-mortem* com cérebro de pacientes bipolares, foi demonstrado que a expressão deste gene estava aumentada no córtex pré-frontal e cerebelo (Horiuchi et al., 2013). Devido a estes achados, Horiuchi e colegas (2013) avaliaram o possível efeito da administração de m-AMPH na atividade locomotora utilizando camundongos nocautes para o gene *Pdlim5* (*Pdlim5*^{-/-}). Estes pesquisadores demonstraram que a intensidade dos efeitos da administração de m-AMPH sobre a atividade locomotora foi menor nos camundongos nocautes do que

em camundongos do tipo selvagem. No mesmo estudo, também se avaliou o efeito da inibição transitória do gene *Pdlim5* por meio da infusão ICV do peptídeo inibidor da translocação de PKC ϵ (PKC ϵ -TIP). Curiosamente, o bloqueio da translocação da PKC ϵ promoveu um efeito antimaníaco semelhante àquele observado nos camundongos nocautes (Horiuchi et al., 2013). Neste cenário, os efeitos antimaníacos decorrentes da inibição da PKC ϵ podem estar relacionados ao fato desta isoforma ter a proteína 5 de domínios PDZ e LIM como um de seus alvos, indicando que esta interação molecular pode ter sido crucial para a deflagração de comportamentos do tipo maníaco nos animais. Esta proteína, juntamente com a PKC ϵ , potencialmente constituem uma interessante plataforma para a triagem de fármacos que, assim como o TMX, sejam eficazes para a terapia dos sintomas maníacos do TB.

Os achados da presente pesquisa indicam que a atividade da PKC ϵ desempenha um papel significativo subjacente à hiperlocomoção e estresse oxidativo no modelo de mania induzido por m-AMPH em ratos. A inibição desta atividade enzimática por meio da microinfusão (ICV) de iPKC ϵ (sc-3095) foi implicada na prevenção de alterações comportamentais e oxidativas associadas ao modelo de mania, o que sugere que a PKC ϵ é um mediador potencial na fisiopatologia do TB. De fato, o locus do gene codificante para a PKC ϵ foi associado a um risco aumentado de suicídio em pacientes afetados por transtornos de humor (Perlis et al., 2010). Estudos adicionais são necessários para se confirmar ou descartar a PKC ϵ como um novo alvo terapêutico para o TB, assim como para a avaliação dos possíveis riscos e efeitos colaterais que poderiam estar associados à inibição desta enzima, uma vez que se trata de uma proteína com importantes funções em vias de transdução de sinal. Uma limitação do presente estudo é que as análises foram realizadas com apenas três isoformas de PKC, de modo que estudos maiores, utilizando mais isoformas e técnicas, podem fornecer um cenário mais abrangente a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que as alterações comportamentais promovidas pela administração de m-amph estão relacionadas com o estado redox celular, visto que o modelo induziu comportamentos do tipo mania, como também alterações nos níveis de 4-HNE, 8-ISO, proteínas carboniladas e 3-NITRO e na atividade de GPx e GR.

O efeito antimaníaco pode estar relacionado com a diminuição dos níveis de 4-HNE, 8-ISO, proteínas carboniladas e 3-NITRO e, com a diminuição da atividade de GPx e com o aumento da atividade de GR, visto que o tratamento com TMX e Li foi capaz de diminuir o comportamento maníaco nos animais. Os resultados também demonstraram que o inibidor específico para a isoforma ϵ foi capaz de diminuir os comportamentos do tipo maníaco induzidos pela administração de m-amph, como também diminuir os níveis de 4-HNE, 8-ISO, proteínas carboniladas e 3-NITRO e, diminuir a atividade de GPx e aumentar a atividade de GR. Os resultados do presente estudo sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia do TB e que isoformas da PKC como a ϵ parecem estar relacionadas com a sinalização celular deste transtorno.

Esses achados podem abrir portas para novas abordagens terapêuticas para o tratamento do TB, focando em fármacos com novos alvos terapêuticos, bem como terapia combinada com diferentes inibidores específicos da PKC.

7 LIMITAÇÕES E DIREÇÕES FUTURAS

É importante ressaltar que no presente estudo foram utilizados ratos machos. Uma vez que as respostas comportamentais e bioquímicas podem variar entre os sexos, esse fato pode ser considerado como uma limitação metodológica e poderá ser realizado em estudos futuros.

A lacuna no conhecimento sobre como os inibidores específicos da PKC podem ser utilizados para o tratamento do TB é pertinente e o presente estudo traz luz aos possíveis mecanismos desses agentes em uma perspectiva neuroquímica. Futuros estudos devem focar em isoformas específicas de proteínas/enzimas, bem como seus alvos específicos, a fim de refinar ainda mais os alvos farmacológicos e potencializar os efeitos terapêuticos dos fármacos.

REFERÊNCIAS

- Abrial E, Bétourné A, Etiévant A, Lucas G, Scarna H, Lambás-Señas L, Haddjeri N. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Oct 31;18(2). pii: pyu031. doi: 10.1093/ijnp/pyu031.
- Abrial E, Etiévant A, Betry C, Scarna H, Lucas G, Haddjeri N, Lambas-Senas L: Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 43: 40–48.
- Amadio M, Battaini F, Pascale A. The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacol Res* 2006; 54: 317–325.
- American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. ed. [s. L.]: Artmed, 2013.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Stertz L, Zanotto C, Ribeiro L, Giasson K, Valvassori SS, Réus GZ, Salvador M, Quevedo J, Gonçalves CA, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2008 Nov;33(6):516-24.
- Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, Young LT, Yatham LN. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009; 34(4):263-71.
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(4):360-8.
- Andreazza AC, Wang JF, Salmasi F, Shao L, Young LT. Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder. *J Neurochem*. 2013; 127(4):552-61.
- Arent CO, Valvassori SS, Fries GR, Stertz L, Ferreira CL, Lopes-Borges J, Mariot E, Varela RB, Ornell F, Kapczinski F, Andersen ML, Quevedo J. Neuroanatomical profile of antimaniac effects of histone deacetylases inhibitors. *Mol Neurobiol*. 2011 ;43:207-14.
- Asano H, Horinouchi T, Mai Y, Sawada O, Fujii S, Nishiya T, Minami M, Katayama T, Iwanaga T, Terada K, Miwa S. Nicotine- and tar-free cigarette smoke induces cell damage through reactive oxygen species newly generated by PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(2):275-87.
- Bailey KL, Kharbanda KK, Katafiasz DM, Sisson JH, Wyatt TA. Oxidative stress associated with aging activates protein kinase C ϵ , leading to cilia slowing. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018 Nov 1;315(5):L882-L890. doi: 10.1152/ajplung.00033.2018.

Bebchuk JM, Arfken CL, Dolan-Manji S, Murphy J, Hasanat K, Manji HK: A preliminary investigation of a protein kinase C inhibitor in the treatment of acute mania. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57: 95–97.

Bech P. The full story of lithium. A tribute to Mogens Schou (1918-2005). *Psychother Psychosom.* 2006;75(5):265-9.

Belmaker RH. Bipolar Disorder. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 351, n. 5, p.476-486, 29 jul. 2004.

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 Jan;35(3):804-17.

Carvalho F, Fernandes E, Remião F, Gomes-Da-Silva J, Tavares MA, Bastos MD. Adaptative response of antioxidant enzymes in different areas of rat brain after repeated d-amphetamine administration. *Addict Biol.* 2001 Jul;6(3):213-221.

Cechinel-Recco K, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Arent CO, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J (2012) Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. *J Psychopharmacol* 26:1594–1604.

Challasivakanaka S, Zhen J, Smith ME, Reith MEA, Foster JD, Vaughan RA. Dopamine transporter phosphorylation site threonine 53 is stimulated by amphetamines and regulates dopamine transport, efflux, and cocaine analog binding. *J Biol Chem.* 2017 Nov 17;292(46):19066-19075. doi: 10.1074/jbc.M117.787002.

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

Chang MY, Lee SH, Kim JH, Lee KH, Kim YS, Son H, Lee YS. (2001) Protein kinase C-mediated functional regulation of dopamine transporter is not achieved by direct phosphorylation of the dopamine transporter protein. *J. Neurochem.* 77, 754-761.

Chu Y, Fioravante D, Leitges M, Regehr WG. Calcium-dependent PKC isoforms have specialized roles in short-term synaptic plasticity. *Neuron.* 2014 May 21;82(4):859-71. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.003.

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. *Am J Psychiatry.* 2005 Oct;162(10):1805-19.

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

Correia MSF, Fernandes SRC, Bernardi MM. Effects of lipopolysaccharide (LPS) administration on stereotypy and catatonia of male adult mice. *Rev Inst Ciênc Saúde* 2008;26(2):215-20.

Cruickshank, CC, Dyer, KR, 2009. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction* 104, 1085–1099.

da-Rosa DD, SS Valvassori, AV Steckert, CO Arent, CL Ferreira, J. Lopes-Borges, RB Varela, E Mariot, F Dal-Pizzol, ML Andersen, J Quevedo, Differences between dextroamphetamine and methamphetamine: behavioral changes and oxidative damage in brain of Wistar rats, *Journal of Neural Transmission* 119 (2012a) 31–38.

da-Rosa DD, SS Valvassori, AV Steckert, F Ornell, CL Ferreira, J Lopes-Borges, RB Varela, F Dal-Pizzol, ML Andersen, J Quevedo, Effects of lithium and valproate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of m-AMPH, *Psychiatry Research* 17 (2012b).

Darke, S, Kaye, S, McKetin, R, Dufrou, J, 2008. Major physical and psychological harms of methamphetamine use. *Drug Alcohol Rev.* 27, 253–262.

Daniels GM and Amara SG (1999) Regulated trafficking of the human dopamine transporter. *J. Biol. Chem.* 274, 35794±35801.

DiazGranados N, Zarate CA Jr (2008) A review of the preclinical and clinical evidence for protein kinase C as a target for drug development for bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep* 10:510–519.

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2006 Jun 15;59(12):1116-27. Epub 2006 Apr 21.

Einat H. Partial effects of the protein kinase C inhibitor chelerythrine in a battery of tests for manic-like behavior in black Swiss mice. *Pharmacol Rep.* 2014 Aug;66(4):722-5. doi: 10.1016/j.pharep.2014.03.013.

Einat H, Manji HK. Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2006 Jun 15;59(12):1160-71. Epub 2006 Feb 2.

Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, Manji 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(3-4):123-31. Epub 2007 Jul 18.

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

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

Feier G, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Varela RB, Bavaresco DV, Scaini G, Morais MO, Andersen ML, Streck EL, Quevedo J (2012) Behavioral changes and brain energymetabolism dysfunction in rats treated with methamphetamine or dextroamphetamine. *Neurosci Lett* 530:75–79

Feier G, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Bavaresco DV, Morais MO, Scaini G, AndersenML, Streck EL, Quevedo J (2013) Lithium and valproate modulate energy metabolism in an animal model of mania induced by methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 103:89–96.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci.* (2006a) ;31:326-32.

Frey BN, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F (2006b) Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disord* 8:275–280. doi:10.1111/j.1399-5618.2006.00318.x

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.* (2006c);79(3):281-6.

Frey BN, Valvassori SS, Gomes KM, Martins MR, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure. *Brain Res.* (2006d);30(1):224-229.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. *Neurochem Res.* 2006e; 31(5):699-703.

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

Gayen JR, Saberi M, Schenk S, Biswas N, Vaingankar SM, Cheung WW, Najjar SM, O'Connor DT, Bandyopadhyay G, Mahata SK. A novel pathway of insulin sensitivity in chromogranin A null mice: a crucial role for pancreastatin in glucose homeostasis. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16;284(42):28498-509. doi: 10.1074/jbc.M109.020636. Epub 2009 Aug 25.

Geddes J, Freemantle N, Harrison P, Bebbington P. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: systematic overview and meta-regression analysis. *BMJ*, [s. L.], v. 321, p.1371-1376, dez. 2000.

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

Gijsman HJ, Geddes JR, Rendell JM, Nolen WA, Goodwin GM. Antidepressants for bipolar depression: a systematic review of randomized, controlled trials. *Am J Psychiatry*. 2004 Sep;161(9):1537-47. Review.

Goodwin GM and Consensus Group of the British Association for Psychopharmacology. Evidence-Based Guidelines for Treating Bipolar Disorder: Recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*. 2003 Jun;17(2):149-73; discussion 147.

Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000 May;28(9): 1349-61.

Guarraci FA, Bolton JL. "Sexy stimulants": the interaction between psychomotor stimulants and sexual behavior in the female brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;121:53-61.

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

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

Hadley SH, Bahia PK, Taylor-Clark TE. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction induces hyperexcitability in airway nociceptors via protein kinase C. *Mol Pharmacol* 2014; 85: 839–848.

Hallak JE, Crippa JA, Quevedo J, Roesler R, Schröder N, Nardi AE, Kapczinski F. National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM): advancing the field of translational medicine and mental health. *Rev Bras Psiquiatr*. 2010 Mar;32(1):83-90.

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

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

Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685–716

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

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

Hodge CW, Raber J, McMahon T, Walter H, Sanchez-Perez AM, Olive MF, Mehmert K, Morrow AL, Messing RO. Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase Cepsilon. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(7):1003-10.

Hoertel N, de Maricourt P, Gorwood P. Novel routes to bipolar disorder drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2013 Aug;8(8):907-18. doi: 10.1517/17460441.2013.804057.

Hoffmann A, Sportelli V, Ziller M, Spengler D. Epigenomics of Major Depressive Disorders and Schizophrenia: Early Life Decides. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):pii:E1711.

Horiuchi, Y, Ishikawa, M, Kaito, N, Iijima, Y, Tanabe, Y, Ishiguro, H, Arinami, T. (2013). Experimental evidence for the involvement of PDLIM5 in mood disorders in hetero knockout mice. *PLoS One* 8, e59320.

Hsieh HL, Tung WH, Wu CY, Wang HH, Lin CC, Wang TS, Yang CM. Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Oct;29(10):1594-601. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.185801.

Huber PC, Almeida WP, Fatima A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Quím. Nova* vol.31 no.5 São Paulo 2008.

Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2003 Jan 15;34(2):145-69.

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.

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(4):233-43.

Jun C, Choi Y, Lim SM, Bae S, Hong YS, Kim JE, Lyoo IK. Disturbance of the glutamatergic system in mood disorders. *Exp Neurobiol* 2014; 23: 28–35.

Kabir NN, Kazi JU. Comparative analysis of human and bovine protein kinases reveals unique relationship and functional diversity. *Genet Mol Biol* 2011; 34: 587–591.

Kanazawa LK, Vecchia DD, Wendler EM, Hocayen PA, Beirão PS Jr, de Melo ML, Dos Reis Lívero FA, Corso CR, Stipp MC, Acco A, Andreatini R. Effects of acute and chronic quercetin administration on methylphenidate-induced hyperlocomotion and oxidative stress. *Life Sci*. 2017 Feb 15;171:1-8. doi: 10.1016/j.lfs.2017.01.007.

Kanazawa LKS, Vecchia DD, Wendler EM, Hocayen PAS, Dos Reis Lívero FA, Stipp MC, Barcaro IMR, Acco A, Andreatini R. Quercetin reduces manic-like behavior and

brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. *Free Radic Biol Med.* 2016 Oct;99:79-86. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.027.

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.

Karp DA and Tanarugsachock V. Mental Illness, Caregiving, and Emotion Management. *Qualitative Health Research*,[s.l.], v. 10, n. 1, p.6-25, 1 jan. 2000.

Kato T, Iwayama Y, Kakiuchi C, Iwamoto K, Yamada K, et al. (2005) Gene expression and association analyses of LIM (PDLIM5) in bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 10: 1045–1055.

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

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

Kazi JU, Kabir NN, Soh JW. Bioinformatic prediction and analysis of eukaryotic protein kinases in the rat genome. *Gene* 2008; 410:147–153.

Keshavarzi S, Kermanshahi S, Karami L, Motaghinejad M, Motevalian M. Protective role of metformin against methamphetamine induced anxiety, depression, cognition impairment and neurodegeneration in rat: The role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathways. *Sadr S Neurotoxicology.* 2019 May;72:74-84. doi: 10.1016/j.neuro.2019.02.004.

Kimura H, Liu S, Yamada S, Uchida K, Matsumoto K, Mukaida M, Yoshida K. Rapid increase in serum lipid peroxide 4-hydroxynonenal (HNE) through monocyte NADPH oxidase in early endo-toxemia. *Free Radic Res.* 2005;39(8):845-51.

Kirlioglu SS, Balcioglu YH, Kalelioglu T, Erten E, Karamustafalioglu N. Comparison of the complete blood count-derived inflammatory markers in bipolar patients with manic and mixed episodes. *Bratisl Lek Listy.* 2019;120(3):195-199. doi: 10.4149/BLL_2019_051.

Knapp P and Beck AT. Cognitive therapy: foundations, conceptual models, applications and research. *Rev Bras Psiquiatr,* 30(Supl II):S54-64, 2008.

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

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.

Kutuk O, Basaga H. Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: a role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway. *Redox Rep.* 2007;12(1):30-4.

Lam DH, Watkins ER, Hayward P, Bright J, Wright K, Kerr N, Parr-Davis G, Sham P. A randomized controlled study of cognitive therapy for relapse prevention for bipolar affective disorder: outcome of the first year. *Arch Gen Psychiatry*, 60(2):145-52, 2003.

Lam DH, McCrone P, Wright K, Kerr N. Cost effectiveness of relapse prevention cognitive therapy for bipolar disorder: 30-month study. *Br J Psychiatry*, 186:500-6, 2005.

Le-Niculescu H, Levey DF, Ayalew M, Palmer L, Gavrin LM, Jain N, Winiger E, Bhosrekar S, Shankar G, Radel M, Bellanger E, Duckworth H, Olesek K, Vergo J, Schweitzer R, Yard M, Ballew A, Shekhar A, Sandusky GE, Schork NJ, Kurian SM, Salomon DR, Niculescu AB 3rd: Discovery and validation of blood biomarkers for suicidality. *Mol Psychiatry* 2013; 18: 1249–1264.

Lloyd AJ, Harrison CL, Ferrier IN, Young AH. The pharmacological treatment of bipolar affective disorder: practice is improving but could still be better. *J Psychopharmacol.* 2003 Jun;17(2):230-3.

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

Ludwig B, Dwivedi Y. Dissecting bipolar disorder complexity through epigenomic approach. *Mol Psychiatry.* 2016;21(11):1490-1498.

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

Machado-Vieira R, Soeiro-De-Souza MG, Richards EM, Teixeira AL, Zarate CA Jr. Multiple levels of impaired neural plasticity and cellular resilience in bipolar disorder: developing treatments using an integrated translational approach. *World J Biol Psychiatry.* 2014 Feb;15(2):84-95. doi: 10.3109/15622975.2013.830775.

McElroy SL and Keck PE Jr. Pharmacologic agents for the treatment of acute bipolar mania. *Biol Psychiatry.* 2000 Sep 15;48(6):539-57. Review.

McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol.* 2013 ; pii: S0006-295200492-9.

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.], v. 379, n. 9817, p.721-728, fev. 2012.

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

Medici, CR, Videbech, P, Gustafsson, LN, and Munk-Jørgensen, P. Mortality and secular trend in the incidence of bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 183, 39–44, 2015.

Melikian HE. Neurotransmitter transport trafficking: endocytosis, recycling and regulation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2004; 104:17-27.

Menegas S, Ferreira CL, Cararo JH, Gava FF, Dal-Pont GC, Gomes ML, Agostini JF, Schuck PF, Scaini G, Andersen ML, Quevedo J, Valvassori SS. Resveratrol protects the brain against oxidative damage in a dopaminergic animal model of mania. *Metab Brain Dis*. 2019 Mar 27. doi: 10.1007/s11011-019-00408-1.

Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE, Zarkov Z. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 241–251, 2011.

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

Melikian HE and Buckley KM (1999) Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter. *J. Neurosci.* 19, 7699±7710.

Minassian A, Young JW, Cope ZA, Henry BL, Geyer MA, Perry W. Amphetamine increases activity but not exploration in humans and mice. *Psychopharmacology. (Berl)*. 2016;233(2):225-33.

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

Moretti M, Valvassori SS, Steckert AV, Rochi N, Benedet J, Scaini G, Kapczinski F, Streck EL, Zugno AI, Quevedo J. Tamoxifen effects on respiratory chain complexes and creatine kinase activities in an animal model of mania. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011; 98:304-10.

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

Moreno RA, Moreno DH, Soares MB, Ratzke R. Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar. *Rev. Bras. Psiquiatr.* vol.26 suppl.3, São Paulo, Oct. 2004.

Nabha SM, Glaros S, Hong M, Lykkesfeldt AE, Schiff R, Osborne K, Reddy KB. Upregulation of PKC-delta contributes to antiestrogen resistance in mammary tumor cells. *Oncogene*. 2005 Apr 28;24(19):3166-76.

Naik MU, Benedikz E, Hernandez I, Libien J, Hrabe J, Valsamis M, Dow-Edwards D, Osman M, Sacktor TC. Distribution of protein kinase Mzeta and the complete protein kinase C isoform family in rat brain. *J Comp Neurol* 2000; 426: 243–258.

Nam Y, Wie MB, Shin EJ, Nguyen TT, Nah SY, Ko SK, Jeong JH, Jang CG, Kim HC. Ginsenoside Re protects methamphetamine-induced mitochondrial burdens and proapoptosis via genetic inhibition of protein kinase C delta in human neuroblastoma dopaminergic SH-SY5Y cell lines. *J Appl Toxicol* 2015; 35: 927–944.

Nestler EJ and Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 13, 1161–1169, 2010.

Nestsiarovich A, Kerner B, Mazurie AJ, Cannon DC, Hurwitz NG, Zhu Y, Nelson SJ, Oprea TI, Unruh ML, Crisanti AS, Tohen M, Perkins DJ, Lambert CG. Comparison of 71 bipolar disorder pharmacotherapies for kidney disorder risk: The potential hazards of polypharmacy. *J Affect Disord*. 2019 Jun 1;252:201-211.

Newton AC. Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2018 Apr;53(2):208-230. doi: 10.1080/10409238.2018.1442408. Review.

Nguyen PT, Dang DK, Tran HQ, Shin EJ, Jeong JH, Nah SY, Cho MC, Lee YS, Jang CG, Kim HC. Methiopropamine, a methamphetamine analogue, produces neurotoxicity via dopamine receptors. *Chem Biol Interact*. 2019 May 25;305:134-147. doi: 10.1016/j.cbi.2019.03.017.

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

Nissen-Meyer LSH, Chaudhry FA. Protein kinase C phosphorylates the system N glutamine transporter SN1 (Slc38a3) and regulates its membrane trafficking and degradation. *Frontiers in endocrinology*. 2013; 4:138.

Ohgami H, Terao T, Shiotsuki I, Ishii N, Iwata N.. Lithium levels in drinking water and risk of suicide. *Br J Psychiatry*. 2009 May;194(5):464-5.

Ohno S, Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem* 2002; 132: 509–511.

Oliveira JL, Silva GB, Abreu KL, Rocha NA, ocha1, Franco LF, Araujo SM, Daher EF. Nefrotoxicidade por lítio. Rev. Assoc. Med. Bras., 2010, vol.56, no.5, p.600-606. ISSN 0104-4230.

Opazo F, Schulz JB, Falkenburger BH. PKC links Gq-coupled receptors to DAT-mediated dopamine release. J Neurochem 2010; 114: 587–596.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007; 47 (1):143-83.

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

Page G, Peeters M, Najimi M, Maloteaux JM, Hermans E. Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat striatal synaptosomes through phosphorylation mediated processes. J Neurochem. 2001 Mar;76(5):1282-90.

Pahl S, Tapken D, Haering SC, Hollmann M. Trafficking of kainate receptors. Membranes 2014; 4: 565–595.

Pandey GN, Dwivedi Y, SridharaRao J, Ren X, Janicak PG, Sharma R. Protein kinase C and phospholipase C activity and expression of their specific isozymes is decreased and expression of MARCKS is increased in platelets of bipolar but not in unipolar patients. Neuropsychopharmacology 2002; 26: 216–228.

Panenka, WJ, Procyshyn, RM, Lecomte, T, MacEwan, GW, Flynn, SW, Honer, WG, Barr, AM, 2013. Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. Drug Alcohol Depend. 129, 167–179.

Pantazopoulos H, Stone D, Walsh J, Benes FM. Differences in the cellular distribution of D1 receptor mRNA in the hippocampus of bipolars and schizophrenics. Synapse. 2004;54(3):147-55.

Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic, San Diego.

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.

Peet M. Induction of mania with selective serotonin re-uptake inhibitors and tricyclic antidepressants. Br J Psychiatry 1994; 164: 549–550.

Perlis RH, Huang J, Purcell S, Fava M, Rush AJ, Sullivan PF, Hamilton SP, McMahon FJ, Schulze TG, Potash JB, Zandi PP, Willour VL, Penninx BW, Boomsma DI, Vogelzangs N, Middeldorp CM, Rietschel M, Nöthen M, Cichon S, Gurling H, Bass N, McQuillin A, Hamshere M; Wellcome Trust Case Control Consortium Bipolar Disorder Group, Craddock N, Sklar P, Smoller JW. Genome-wide association study

of suicide attempts in mood disorder patients. *Am J Psychiatry* 2010; 167: 1499–1507.

Perugi G, Vannucchi G, Bedani F, Favaretto E. Use of stimulant in bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 2017;19(1):7.

Pettorruso M, Di Nicola M, De Risio L, Fasano A, Martinotti G, Conte G, Bentivoglio AR, Janiri L. Punding behavior in bipolar disorder type 1: case report. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2014 Fall;26(4):E8-9. doi: 10.1176/appi.neuropsych.13090217.

Pristupa ZB, McConkey F, Liu F, Man HY, Lee FJS, Wang YT, Niznik HB (1998) Protein kinase-mediated bidirectional trafficking and functional regulation of the human dopamine transporter. *Synapse.* 30, 79-87.

Rahimi Borumand M, Motaghinejad M, Motevalian M, Gholami M. Duloxetine by modulating the Akt/GSK3 signaling pathways has neuroprotective effects against methamphetamine-induced neurodegeneration and cognition impairment in rats. *Iran J Med Sci.* 2019 Mar;44(2):146-154.

Rihmer, Z, and Kiss, K. Bipolar disorders and suicidal behaviour. *Bipolar Disord.* 4, 21–25, 2002.

Robinson MB. Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *J Neurochem.* 2002; 80:1-11.

Rowland TA, Marwaha S. Epidemiology and risk factors for bipolar disorder. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2018;8(9):251-269.

Sachs GS, Lafer B, Stoll AL, Banov M, Thibault AB, Tohen M, Rosenbaum JF. A double-blind trial of bupropion versus desipramine for bipolar depression. *J Clin Psychiatry* 55:391-393, 1994.

Sanchez-Bautista S, Nicolas FE. Recent patents concerning modulators of protein kinase C. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2013; 7: 74–81.

Saha, K, Sambo, D, Richardson, BD, Lin, LM, Butler, B, Villarroel, L, Khoshbouei, H, 2014. Intracellular methamphetamine prevents the dopamine-induced enhancement of neuronal firing. *J. Biol. Chem.* 289, 22246–22257.

Sarai SK, Mekala HM, Lippmann S. Lithium Suicide Prevention: A Brief Review and Reminder. *Innov Clin Neurosci.* 2018 Nov 1;15(11-12):30-32. Review.

Saxena A, Scaini G, Bavaresco DV, Leite C, Valvassori SS, Carvalho AF, Quevedo J. Role of Protein Kinase C in Bipolar Disorder: A Review of the Current Literature. *Mol Neuropsychiatry.* 2017 Nov;3(2):108-124. doi: 10.1159/000480349. Epub 2017 Oct 7. Review. Erratum in: *Mol Neuropsychiatry.* 2018 Feb;3(3):180.

Scaini G, Fries GR, Valvassori SS, Zeni CP, Zunta-Soares G, Berk M, Soares JC, Quevedo J. Perturbations in the apoptotic pathway and mitochondrial network dynamics in peripheral blood mononuclear cells from bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*. 2017 May;7(5):e1111. doi: 10.1038/tp.2017.83.

Schou M, Juel-Nielsen N, Strömngren E, Voldby H. The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1954; 17: 250–260.

Schroeder E, Gao Y, Lei Z, Roisen F, El-Mallakh RS. The gene BRAF is underexpressed in bipolar subject olfactory neuroepithelial progenitor cells undergoing apoptosis. *Psychiatry Res*. 2016 Feb 28;236:130-135. doi: 10.1016/j.psychres.2015.12.018.

Shi J, Badner JA, Liu C (2008) PDLIM5 and susceptibility to bipolar disorder: a family-based association study and meta-analysis. *Psychiatr Genet* 18: 116–121.

Shin EJ, Bach JH, Nguyen TT, Nguyen XK, Jung BD, Oh KW, Kim MJ, Ko SK, Jang CG, Ali SF, Kim HC. *Gastrodia elata* bl attenuates methamphetamine-induced dopaminergic toxicity via inhibiting oxidative burdens. *Curr Neuropharmacol*. 2011 Mar;9(1):118-21. doi: 10.2174/157015911795016967.

Shin EJ, Dang DK, Hwang YG, Tran HQ, Sharma N, Jeong JH, Jang CG, Nah SY, Nabeshima T, Yoneda Y, Cadet JL, Kim HC. Significance of protein kinase C in the neuropsychotoxicity induced by methamphetamine-like psychostimulants. *Neurochem Int*. 2019 Mar;124:162-170. doi: 10.1016/j.neuint.2019.01.014.

Sigitova E, Fišar Z, Hroudová J, Cikánková T, Raboch J (2017). Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 71(2):77–103.

Simon GE, Bauer MS, Ludman EJ, Operskalski BH, Unutzer J. Mood symptoms, functional impairment, and disability in people with bipolar disorder: specific effects of mania and depression. *J Clin Psychiatry* 2007a; 68: 1237–1245.

Simon GE, Hunkeler E, Fireman B, Lee JY, Savarino J. Risk of suicide attempt and suicide death in patients treated for bipolar disorder. *Bipolar Disord*. Aug;9(5):526-30, 2007b.

Squassina A, Manchia M, Manconi F, Piccardi M, Ardu R, et al. (2008) A casecontrol association study of the PDLIM5 gene and bipolar disorder in a Sardinian sample. *Psychiatr Genet* 18: 128–132.

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.

Steckert AV, Valvassori SS, Mina F, Lopes-Borges J, Varela RB, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J: Protein kinase C and oxidative stress in an animal model of mania. *Curr Neurovasc Res* 2012; 9: 47–57.

Steckert AV, Valvassori SS, Varela RB, Mina F, Resende WR, Bavaresco DV, Ornell F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effects of sodium butyrate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of D-AMPH. *Neurochem Int.* 2013; 62:425-32.

Suganthi N, Devi KP, Nabavi SF, Braidy N, Nabavi SM. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: focusing on the mechanisms of actions. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 892–908.

Sulzer, D, Sonders, MS, Poulsen, NW, Galli, A., 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog. Neurobiol.* 75, 406–433.

Taheri P, Keshavarzi S, Ebadi M, Motaghinejad M, Motevalian M. Neuroprotective effects of forced exercise and bupropion on chronic methamphetamine-induced cognitive impairment via modulation of cAMP response element-binding protein/brain-derived neurotrophic factor signaling pathway, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in rats. *Adv Biomed Res.* 2018 Dec 19;7:151. doi: 10.4103/abr.abr_11_18. eCollection 2018.

Torres GEWD, Yao Mohn AR, Quan H, Kim KM, Levey AI, Staudinger J, Caron MG (2001) Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron.* 30, 121±134.

Turan T, Eşel E, Tokgöz B, Aslan S, Sofuoğlu S, Utaş C, Keleştimur F.. Effects of short- and long-term lithium treatment on kidney functioning in patients with bipolar mood disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002 Apr;26(3):561-5.

Turner RS, Raynor RL, Mazzei GJ, Girard PR, Kuo JF. Developmental studies of phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein kinase and its substrates and of phosphoprotein phosphatases in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3143–3147.

United Nations Office on Drugs and Crime, 2017. World Drug Report 2017. http://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet_1_EXSUM.pdf, Accessed date: 22 May 2018.

Uribe E, Wix R. Neuronal migration, apoptosis and bipolar disorder. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 2012 Apr-Jun;5(2):127-33. doi: 10.1016/j.rpsm.2011.11.005.

Valvassori SS, Elias G, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Trzesniak C, Tumas V, Dursun S, Chagas MH, Hallak JE, Zuardi AW, Quevedo J, Crippa JA (2011) Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychopharmacol* 25(2):274–280

Valvassori SS, Budni J, Varela RB, Quevedo J. Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013a;35 Suppl 2:S121-31. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1168.

Valvassori SS, Calixto KV, Budni J, Resende WR, Varela RB, de Freitas KV, Gonçalves CL, Streck EL, Quevedo J. Sodium butyrate reverses the inhibition of

Krebs cycle enzymes induced by amphetamine in the rat brain. *J Neural Transm.* (2013b) ;120:1737-42.

Valvassori SS, Petronilho FC, Réus GZ, Steckert AV, Oliveira VB, Boeck CR, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008 May 15;32:1064-8.

Valvassori SS, Varela RB, Quevedo J. Animal models of mood disorders: focus on bipolar disorder and depression. In: Conn PM, animal models for the study of human disease. Academic Press, London, 2017a, 991-1002.

Valvassori SS, Dal-Pont GC, Resende WR, Varela RB, Lopes-Borges J, Cararo JH, Quevedo J. Validation of the animal model of bipolar disorder induced by Ouabain: face, construct and predictive perspectives. *Transl Psychiatry.* 2019 Jun 4;9(1):158. doi: 10.1038/s41398-019-0494-6.

Vasan S, Olango GJ. Amphetamine Toxicity. StatPearls [Internet]. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470276/>.

Vieta E and Morilla I. Early group psychoeducation for bipolar disorder. *Lancet Psychiatry*, Nov;3(11):1000-1001, 2016.

Vogel M, Pfeifer S, Schaub RT, Grabe HJ, Barnow S, Freyberger HJ, Cascorbi I. Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology.* 2004;50(4):305-10.

Wang J, Fanous S, Terwilliger EF, Bass CE, Hammer RP Jr, Nikulina EM. BDNF overexpression in the ventral tegmental area prolongs social defeat stress-induced cross-sensitization to amphetamine and increases Δ FosB expression in mesocorticolimbic regions of rats. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(11):2286-96.

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.

Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, Hannun YA. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* 1992; 117: 121–133.

Yildiz A, Guleryuz S, Ankerst DP, Ongür D, Renshaw PF. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania: a double-blind, placebocontrolled trial of tamoxifen. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65:255- 63.

Yildiz A, Vieta E, Tohen M, Baldessarini RJ. Factors modifying drug and placebo responses in randomized trials for bipolar mania. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14:863-75.

Young AH and Hammond JM. Lithium in mood disorders: increasing evidence base, declining use? *The British Journal of Psychiatry*, [s.l.], v. 191, n. 6, p.474-476, 1 dez. 2007.

Young AH, Macpherson H. Detection of bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2011 Jul;199:3-4.

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

Zarate CA, Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, Singh J, Charney DS, Manji HK. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1003: 273–291.

Zarate CA, Manji HK (2009). Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS Drugs* 23:569–582.

Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Quiroz J, Jolkovsky L, Luckenbaugh DA, Manji HK. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar Disord*. 2007;9:561-70.

Zarate CA, Singh J, Manji HK. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 1006–1020.

Zarate CA, Tohen M. Anticonvulsants. Carbamazepine. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. *Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry*. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; c2000.

Zhao L, Lin Y, Lao G, Wang Y, Guan L, Wei J, Yang Z, Ni P, Li X, Jiang Z, Li T, Hao X, Lin D, Cao L, Ma X. Association study of dopamine receptor genes polymorphism with cognitive functions in bipolar I disorder patients. *J Affect Disord*. 2015;170:85-90.

Zhang JP, Xia JM, Sun GY. Chronic ethanol inhibits inositol metabolism in specific brain regions. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 Jun;21(4):716-20.

Zhang WY, Wang KY, Li YJ, Li YR, Lu RZ. Chronic stress causes protein kinase C epsilon-aldehyde dehydrogenase 2 signaling pathway perturbation in the rat hippocampus and prefrontal cortex, but not in the myocardium. *Neural Regen Res*. 2018 Jul;13(7):1225-1230. doi: 10.4103/1673-5374.235060.

Zhou Z, Wang Y, Tan H, Bharti V, Che Y, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizer lithium inhibits amphetamine-induced risk-taking manic-like behaviors. *Neurosci Lett*. 2015;603:84-8.

Zhu SJ, Kavanaugh MP, Sonders MS, Amara SG, Zahniser NR. (1997) Activation of protein kinase C inhibits uptake, currents and binding associated with the human

dopamine transporter expressed in xenopus oocytes. J. Pharm. Exp. Ther. 282, 1358±1365.

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



Resolução

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

Protocolo: 007/2013

Professor Responsável: João Quevedo

Equipe: Emílio Luiz Streck, Gabriela Kozuchovski Ferreira, Roger Varela, Daniela V. Bavareseco, Samira Valvassori, Juliane F. Carvalho, Leticia F. Calegari, Gustavo C. Dal Pont, Camila O. Arent, Wilson R. Resende, Josiane Budni.

Título: "Investigação pré-clínica do potencial terapêutico de inibidores de Proteína Quinase C em modelos de transtornos do humor."

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 594 Ratos Wistar 60 300g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net.*

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 007/2013

Principal Investigator: João Quevedo

Researchers: Emílio Luiz Streck, Gabriela Kozuchovski Ferreira, Roger Varela, Daniela V. Bavareseco, Samira Valvassori, Juliane F. Carvalho, Leticia F. Calegari, Gustavo C. Dal Pont, Camila O. Arent, Wilson R. Resende, Josiane Budni.

Project title: "Preclinical investigation of the therapeutic potential of inhibiting Protein Kinase C in models of mood disorders."

*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.unesp.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesp.net.*

Criciúma, 19 de fevereiro de 2013.

Patrícia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA