

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAMELA SABIONI

EFEITO ANTIMANÍACO DO TAMOXIFENO EM MODELO ANIMAL

CURITIBA

2007

PAMELA SABIONI

EFEITO ANTIMANÍACO DO TAMOXIFENO EM MODELO ANIMAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2007

Dedico este trabalho
Aos meus pais, Marcos e Vera, às minhas irmãs, Priscila e Patricia, aos meus
sobrinhos Agatha e Gabriel, e ao meu amor, Denner.
Por todo o amor, apoio e incentivo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Vera, pelo incentivo para continuar sempre, por acreditarem em mim e pelo amor constante. Por construírem a minha vida de uma maneira tão maravilhosa, obrigada!

À minha irmã, Priscila, que me serviu como exemplo de vida e me fez seguir seus passos. Que me deu coragem para continuar e nunca desistir de meus sonhos. Você foi fundamental para o sucesso nesta etapa da minha vida.

Ao meu amor, Denner, por todo o carinho, companheirismo, amizade, compreensão e apoio nas horas mais difíceis, por cuidar de mim sempre e por todo o amor que recebo. Amo você!

Ao meu orientador Roberto Andreatini, pela amizade, ensinamentos, confiança e incentivo na realização deste trabalho. Por acreditar em mim e pela grandiosa orientação durante todo o período.

À Sílvia N. Cordazzo, pela assistência técnica prestada sempre com prontidão e carinho.

À Ester Ninomiya, à Irinéia Baretta e à Lianna Gustafson, pela amizade, companheirismo e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Às minhas amigas do mestrado, Camila, Michele, Yara, Amanda, Izonete (Cris) e Zaira, por estarem sempre comigo, por me acolherem, pela ajuda, compreensão, paciência e carinho, apesar das dificuldades enfrentadas.

A todos que de alguma maneira tiveram alguma participação neste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original”
Albert Einstein*

Nota Explicativa:

Dissertação apresentada em formato alternativo – artigos para publicação – conforme aceito pelas normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Drogas e Tratamento.....	19
3.3. Teste de Locomoção – Caixa de Locomoção Espontânea.....	21
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Influência do intervalo de tempo entre a administração de anfetamina e avaliação da atividade locomotora.....	23
5.2. Efeito do carbonato de lítio sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina	24
5.3. Efeito do tamoxifeno sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	25
5.4. Efeito da queleritrina sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	26
5.4. Efeito do clomifeno sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	27
5.5. Efeito da medroxiprogesterona sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	29
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1:	Influência do intervalo de tempo entre a administração de anfetamina e avaliação da atividade locomotora.....	23
Figura 2:	Efeito do carbonato de lítio sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	24
Figura 3:	Efeito do tamoxifeno sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	25
Figura 4:	Efeito da queleritrina sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	27
Figura 5:	Efeito do clomifeno sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	28
Figura 6:	Efeito da medroxiprogesterona sobre a Hiperlocomoção induzida pela anfetamina.....	29
Tabela 1:	Grupos formados para as etapas 2 e 3.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina tri-fosfato

DA – Dopamina

DAG – Diacilglicerol

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

MPA – Medroxiprogesterona

PKC – Proteína Quinase C (Protein Kinase C)

SNC – Sistema Nervoso Central

TAB – Transtorno Afetivo Bipolar

EFEITO ANTIMANÍACO DO TAMOXIFENO EM MODELO ANIMAL

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia.

Endereço: Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba – PR

Caixa Postal: 190-31 CEP: 81531-980

e-mail do responsável: psabioni@gmail.com

RESUMO

O transtorno afetivo bipolar é um distúrbio caracterizado por alterações intensas e persistentes do humor, na qual o paciente pode alternar entre as fases de depressão e mania. O tratamento padrão para esta doença, quando ocorrem episódios maníacos, é geralmente realizado com estabilizadores do humor (lítio e anticonvulsivantes), sendo o lítio e o valproato de sódio as drogas mais utilizadas. Ainda não foram totalmente esclarecidas as alterações que ocorrem na fase maníaca, embora alterações da via de sinalização intracelular da proteína quinase C (PKC) têm sido propostas. Estudos recentes têm mostrado associado um aumento da atividade da PKC nos quadros maníacos e a sua inibição pelo lítio e valproato. Estudos clínicos recentes têm apresentado resultados positivos com o tamoxifeno, uma droga antiestrogênica com atividade inibitória sobre a PKC. Entretanto, estes estudos não foram capazes de corroborar a participação da inibição da PKC no efeito antimaniaco do tamoxifeno. Em nosso estudo, em camundongos, observamos que o tamoxifeno (1mg/kg, via s.c.) bloqueou a hiperlocomoção provocada pela anfetamina (3mg/kg, via i.p.), um modelo animal de estado maníaco. O tamoxifeno inibiu totalmente a ação da anfetamina na atividade locomotora, sem alterar a locomoção normal dos animais não tratados com anfetamina. No entanto, o tamoxifeno apresenta ações estrogênicas e antiestrogênicas (é um modulador seletivo de receptores estrogênicos), além de ter um potente efeito inibitório sobre a atividade da PKC. Para se investigar o mecanismo de ação pelo qual o tamoxifeno inibiu a hiperlocomoção provocada pela anfetamina, foram feitos experimentos com a medroxiprogesterona (1, 3 e 6 mg/kg, via s.c.), uma droga antiestrogênica, e com um inibidor específico da PKC, a queleritina (1µg/animal, via i.c.v). A medroxiprogesterona, apenas na dose de 3mg/kg, foi capaz de inibir parcialmente a ação da anfetamina. Nenhum efeito inibitório foi observado nas outras doses. Por outro lado, a queleritina inibiu totalmente a ação hiperlocomotora induzida pela anfetamina, sem prejudicar a atividade locomotora dos animais não tratados com anfetamina. Pode-se sugerir, portanto, que o principal mecanismo pelo qual o tamoxifeno produz seus efeitos antimaniacos é pela inibição da proteína quinase C, podendo este ser o alvo para o desenvolvimento de novas drogas para o transtorno afetivo bipolar.

Palavras-chave: tamoxifeno, modelo animal, mania, estabilizadores do humor.

ABSTRACT

The bipolar affective disorder is a disease characterized by intense and persistent mood changes, in which the patient can alternate depressive and manic phases. The pharmacological treatment for the manic phase generally employs mood stabilizers (lithium and anticonvulsants); lithium and valproate are the most frequently drugs used. Until now, it is not clear the cellular mechanisms associated with manic state, although changes in protein kinase C (PKC) intracellular signalization have been proposed. Recent studies have been showed an increase in PKC activity associated to manic state, which are attenuated by lithium and valproate. Clinical recent studies presented positive findings with tamoxifen, an estrogenic receptor modulator drug with PKC inhibitory activity. However, these studies cannot corroborate the tamoxifen's PKC activity in it antimanic effect. Our study observed that tamoxifen (1 mg/kg, s.c.) blocked the amphetamine-induced hyperlocomotion in mice, an animal model for manic state. Tamoxifen blocked totally the effect of amphetamine in mice's locomotor activity, without any effect in locomotor activity in the absence of amphetamine. Since tamoxifen has anti-estrogenic and PKC inhibitory activities, we also studied the effect of medroxyprogesterone (1, 3, and 6 mg/kg, s.c.), an anti-estrogenic drug, and chelerythrine (1 μ g/ mice, icv), a PKC inhibitor, on amphetamine-induced hyperlocomotion. Only the intermediate dose of medroxyprogesterone partially reduced the amphetamine-induced hyperlocomotion. On the other hand, chelerythrine blocked the amphetamine-induced hyperlocomotion, without any effect in the mice's locomotor activity in the absence of amphetamine. Thus, it is suggested that tamoxifen's antimanic-like effect results from PKC inhibition, which can be a new target to develop new mood stabilizers.

Key-words: tamoxifeno, animal model, mania, mood stabilizers.

1. INTRODUÇÃO

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é classificado como um transtorno de humor que é caracterizado por períodos de alternância entre os estados de depressão e mania, em que cada fase pode durar vários dias. Os estabilizadores do humor são usados no tratamento no transtorno bipolar, apresentando benefícios em aspectos primários do transtorno bipolar, tais como episódios maníacos, depressivos, ciclagem, número de episódios, mostrando-se efetivos nas fases agudas e de manutenção (BOWDEN, 2002). Portanto, parecem agir para proteger contra episódios maníacos futuros (KECK & MANJI, 2002; MANJI & LENOX, 1998). O lítio, um dos tratamentos mais usados, pode agir também potencializando o efeito de antidepressivos, pois causa aumento da liberação de serotonina (5-HT) tanto basal quanto induzida por estímulos (BRUNELLO, 2004; BRUNELLO & TASCEDDA, 2003). Além do lítio, as principais drogas desta classe são o ácido valproico, a carbamazepina e, mais recentemente, a lamotrigina, que são utilizados primariamente como anticonvulsivantes. Embora sejam eficazes, uma parcela significativa dos pacientes bipolares é resistente às drogas atuais, além destas serem associadas a efeitos adversos significativos, diminuindo a adesão ao tratamento.

O lítio é um potente inibidor das vias de inositol na formação de segundos mensageiros intracelulares, além de inibir a proteína quinase C (PKC), mecanismos que vêm sendo extensivamente estudados no intuito de se descobrir as funções destes sistemas no desenvolvimento da doença bipolar (HAHN & FRIEDMAN, 1999). No que se refere à PKC, o lítio inibe sua ativação e diminui as conseqüências funcionais causadas pela estimulação desta enzima (WANG & FRIEDMAN, 1999). Em estudo *post mortem*, foi demonstrado um aumento da atividade da PKC no córtex frontal de pacientes bipolares (WANG & FRIEDMAN, 1996). Além disto, observa-se um aumento da translocação de PKC do citosol à membrana de plaquetas de pacientes bipolares, o que é atenuado pela administração de lítio e com a melhora dos sintomas maníacos (FRIEDMAN *et al*, 1993).

Existente em altas concentrações no cérebro, a PKC exerce funções importantes na regulação da neurotransmissão tanto pré quanto pós-sináptica. A PKC é uma quinase ativada pelo Ca^{++} e pelo diacilglicerol (DAG), sendo que é responsável pela fosforilação de várias proteínas intracelulares. É uma família de

subespécies intimamente relacionadas em sua estrutura, mas com ações diferenciadas de acordo com as subespécies e locais de ação, tendo distribuição heterogênea no cérebro e se apresentando com altos níveis nos nervos terminais pré-sinápticos. (BRUNELLO & TASCEDA, 2003). O principal substrato da PKC é a MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate), que desempenha importante papel na plasticidade neuronal. Além disto, a PKC também tem papel relevante na excitabilidade neuronal e na liberação de neurotransmissores (MANJI & CHEN, 2002).

A PKC consiste em um dos principais mediadores intracelulares, sendo gerada através de estimulação externa de uma variedade de receptores de neurotransmissores (como por exemplo, muscarínicos m_1 e m_3 , noradrenérgicos α -1 e serotonérgicos 5-HT_{2A}).

Atualmente são conhecidas 12 subespécies de PKC, que apresentam localização intracelular e especificidade diferentes. As diferentes subespécies foram divididas em três classes principais, convencionais (cPKC: α , β I/ β II e γ), novas (nPKC: δ , ϵ , η e θ) e atípicas (aPKC: ζ e λ), intimamente relacionadas em suas estruturas mas apresentam algumas particularidades. A estrutura convencional (cPKCs) apresenta quatro regiões conservadas (C1 – C4) e cinco regiões variáveis (V1-V5). A região C1 é geralmente composta por dois dedos de zinco ricos em cisteína, que são essenciais para a ligação ao DAG e ésteres de forbol; a região C2 é a região que confere a sensibilidade das enzimas ao cálcio; a região C3 contém o domínio catalítico da enzima e a região C4 reconhece os substratos enzimáticos para serem fosforilados. Então, as cPKCs, que possuem a região C1 como descrito acima, são dependentes de cálcio e DAG para sua atividade. Como as nPKCs e aPKCs não possuem a região C2, não são dependentes de cálcio para exercerem sua atividade. Além disso, a região C1 das aPKCs possuem somente um dedo de zinco rico em cisteína, não sendo desta maneira ativadas pelo DAG ou ésteres de forbol (HAHN & FRIEDMAN, 1999).

O tamoxifeno é uma droga sintética pertencente à classe das drogas moduladoras seletivas de receptores estrogênicos (Selective Estrogen Receptors Modulators - SERMs), ou seja, pode funcionar como agonista em alguns tecidos, como por exemplo o tecido mamário, e antagonista em outros, como os tecidos cardíaco, endometrial e ósseo (RIGGINS *et al*, 2007). Além disso, possui um

segundo mecanismo de ação importante, que é a inibição da atividade da proteína quinase C.

Atualmente, o tamoxifeno é amplamente usado no tratamento de câncer de mama em estágios iniciais e na prevenção da recorrência de tumores malignos nos tecidos mamários. Esta droga foi escolhida para nosso trabalho por ser a única droga com este efeito inibitório sobre a proteína quinase C no sistema nervoso central que pode ser administrada periféricamente e que foi aprovada para uso em humanos (BALTUCH *et al*, 1993).

Adicionalmente, o tamoxifeno possui várias outras ações não genômicas, tais como redução do estresse oxidativo (embora em certas situações seja associado a aumento do estresse oxidativo), perturbação da função da membrana celular e inibição da calmodulina, que também poderiam contribuir para os efeitos do tamoxifeno (CLARKE *et al.*, 2001).

Quanto aos efeitos adversos, em geral, o tamoxifeno é bem tolerado pelos pacientes. Em estudo realizado com pacientes que se encontravam na fase maníaca, nenhum deles descontinuou o tratamento devido a efeitos adversos. Perda de apetite, no entanto, foi um efeito observado no tratamento, que ocorreu com uma frequência estatisticamente significativa (ZARATE *et al*, 2007).

Em quatro estudos clínicos, o tamoxifeno foi utilizado em pacientes que apresentavam sintomas maníacos e revelou resultados promissores. No primeiro, publicado em 2000 por Bebchuk *et al*, 7 pacientes, homens e mulheres, receberam tamoxifeno em doses crescentes de 10mg/dia a 80mg/dia em um período de 4 a 15 dias de tratamento. Neste estudo, os pacientes apresentaram uma melhora significativa dos sintomas maníacos, demonstrada pela redução na pontuação da escala de Young (YMRS – Young Mania Rating Scale). No entanto, esta pesquisa apresenta algumas limitações. Além de os clínicos conhecerem o tratamento aplicado aos pacientes, dois destes pacientes já estavam sob tratamento padrão para transtorno bipolar. Acrescenta-se ainda a limitação do pequeno número de pacientes submetidos ao tratamento.

Em um outro estudo publicado por Kulkarni *et al.* (2006), 13 mulheres foram randomizadas em três grupos experimentais, sendo eles tamoxifeno (40mg/dia), medroxiprogesterona (MPA, 20mg/dia) ou placebo. O acetato de medroxiprogesterona, droga utilizada neste estudo, é uma progestina sintética com ações antiestrogênicas indiretas, pois antagoniza o efeito do estrogênio em locais

específicos. Este estudo foi realizado em 28 dias consecutivos, duplo-cego, e as pacientes que receberam tamoxifeno demonstraram uma melhora significativa ao longo do tratamento, um pouco mais acentuada do que o grupo medroxiprogesterona, reveladas pela redução na escala CARS-M (Clinician-Administered Rating Scale for Mania). Embora estes resultados indiquem um efeito antimaníaco do tamoxifeno, eles não permitem concluir se o efeito alcançado pelo tamoxifeno foi devido à sua ação inibitória sobre a PKC, ao seu efeito antiestrogênico ou a uma soma destes dois, já que a MPA também apresentou uma capacidade de melhorar os sintomas maníacos, embora menos eficaz que o tamoxifeno. Além disso, esta pesquisa também apresenta a limitação de que todas as mulheres já estavam submetidas ao tratamento padrão para o transtorno bipolar com o Lítio ou Valproato.

Em 2007, foram publicados outros dois estudos clínicos com o uso do tamoxifeno. O primeiro, realizado por Yildis-Yesiloglu (2007), realizado com 50 pacientes, randomizados entre os grupos tamoxifeno ou placebo (por 3 semanas), duplo-cego. Destes 50 pacientes, 29 receberam tamoxifeno e 14 apresentaram uma melhora igual ou superior a 50% medido pela escala Young, enquanto apenas um dos 21 pacientes do grupo placebo apresentou uma melhora semelhante. A dose de tamoxifeno utilizada neste trabalho não foi especificada (YILDIS-YESILOGLU, 2007). O outro trabalho, realizado por Zarate *et al.* (2007), empregaram tratamento com tamoxifeno de 20 a 140mg/dia (dose flexível) ou placebo por 3 semanas, em esquema duplo-cego, com um total de 58 pacientes. Dos pacientes que receberam tamoxifeno, 63% tiveram uma resposta positiva, medida pelo decréscimo de 50% ou mais na pontuação da escala de Young desde o início do tratamento, enquanto apenas 13% dos pacientes do grupo placebo apresentaram resposta positiva. Este estudo foi de monoterapia, sendo permitida apenas a adição de benzodiazepínicos (ZARATE *et al.*, 2007).

Existem relativamente poucos modelos animais de mania. Um dos mais aceitos para avaliar a eficácia de drogas a serem utilizadas no TAB, mais especificamente a fase maníaca, é induzir o aumento da atividade locomotora de animais com uma substância estimulante do sistema nervoso central, por exemplo, a anfetamina (EINAT, 2007, GOULD *et al.*, 2001). Este modelo promove mudanças comportamentais e respostas ao tratamento que são semelhantes à doença bipolar, sendo que, além do aumento da atividade motora, outros sinais semelhantes à

mania também podem ser observados, como por exemplo, redução do sono, distraibilidade (avaliada por tarefas de aprendizagem) e comportamento de risco (EINAT, 2006; KATO *et al*, 2007). A inibição destes efeitos comportamentais induzidos pela anfetamina por estabilizadores do humor (p.ex. lítio) garante ao modelo validade preditiva (EINAT, 2006).

Além de a anfetamina induzir um comportamento muito freqüente em pacientes maníacos, a hiperlocomoção (validade de face), tanto a administração aguda quanto crônica da anfetamina produz um aumento da atividade da PKC no SNC e um aumento na fosforilação de um dos seus principais substratos neuronais, a GAP-43, que está envolvida na liberação de neurotransmissores (MANJI & LENOX, 1999). Há muitas evidências que mecanismos de transdução de sinal podem contribuir para a liberação de DA induzida pela anfetamina (BROWMAN *et al*, 1998), por exemplo, que ésteres de forbol e lipídios, que ativam a PKC, aumentam a liberação de DA de sinaptossomas *in vitro* (DAVIS & PATRICK, 1990). Ao contrário, inibidores seletivos de PKC bloqueiam a liberação de DA induzida por anfetamina em estriado de ratos na ausência de ativadores de PKC (KANTOR & GNEGY, 1998).

Acrescenta-se a este modelo validade de constructo, pois há envolvimento do sistema dopaminérgico no comportamento maníaco (MANJI *et al*, 2007) e a anfetamina aumenta a liberação e diminui a recaptção de dopamina (DA) no sistema nervoso central.

Em trabalho realizado recentemente, Einat *et al* (2007) demonstraram a eficácia do tamoxifeno em modelo animal de mania. Neste estudo, foi investigado o efeito do tamoxifeno (1mg/kg) em duas injeções diárias no comportamento de hiperlocomoção produzido pela anfetamina (0,5mg/kg) administrada aguda (uma vez) ou repetidamente (sete dias) e na fosforilação da GAP-43 em ratos machos. O tamoxifeno reduziu significativamente a hiperatividade produzida pela anfetamina no campo aberto. Além disso, o tamoxifeno também atenuou a fosforilação da GAP-43, um resultado consistente com as observações comportamentais, sugerindo que possivelmente a via de sinalização da PKC exerce uma função muito importante na patofisiologia e no tratamento do transtorno afetivo bipolar (EINAT *et al*, 2007).

Em vista disso, há a necessidade de se esclarecer se o tamoxifeno apresenta de fato um potencial antimaníaco, e se este potencial se manifesta pelo mecanismo anti-estrogênico, semelhante ao estudo realizado com a medroxiprogesterona, ou

pelo mecanismo inibidor da PKC, que ultimamente vem sendo muito evidenciado em estudos do TAB na fase maníaca.

Em nosso estudo, procuramos avaliar qual via contribui para o efeito do tamoxifeno, a via hormonal ou a via de sinalização da PKC, e assim identificar a estratégia para o desenvolvimento de novas drogas antimaníacas. Para isso, escolhemos o modelo animal de mania com indução da hiperlocomoção pela anfetamina em camundongos. Primeiramente, tentamos o bloqueio deste comportamento com o uso do Lítio para validar o modelo. Em uma segunda etapa, substituímos o lítio pelo tamoxifeno para comparar a eficácia da droga sobre este efeito provocado pela anfetamina. Como o tamoxifeno é uma droga que possui ação bloqueadora sobre as duas vias que podem contribuir para seu efeito antimaníaco (ação antiestrogênica e inibidora da atividade da proteína quinase C), também utilizamos a medroxiprogesterona, com ação somente antiestrogênica, e a queleritrina, uma droga que inibe o local de ligação ao ATP ou substrato no domínio catalítico da PKC, inibindo assim sua atividade (ALMEIDA *et al*, 2006). Além destas drogas especificadas, utilizamos também o clomifeno, que é, como o tamoxifeno, um agente modulador seletivo de receptor de estrogênio (SERM). Liga-se ao receptor de estrogênio no hipotálamo, que subsequentemente resulta em níveis de FSH elevados (LONDON *et al*, 2000). Além disto, apresenta efeito inibitório sobre a PKC (EDASHIGE *et al.*, 1991).

Sendo assim, o presente estudo visa elucidar o principal mecanismo de ação pelo qual o tamoxifeno exerce seus efeitos antimaníacos, ou seja, pelo mecanismo antiestrogênico ou pela via de inibição da proteína quinase C.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antimaníaco do tamoxifeno em modelo animal e investigar o seu mecanismo de ação.

1.2. Objetivos específicos

1. Determinar as condições experimentais para induzir um aumento da atividade locomotora em camundongos pela administração aguda de anfetamina;
2. Validar o modelo, através da avaliação do efeito do Lítio, droga padrão para tratamento de mania, no aumento da atividade locomotora induzida pela anfetamina;
3. Avaliar o efeito do tamoxifeno no aumento da atividade locomotora induzida pela anfetamina;
4. Avaliar o efeito da queleritrina, uma droga inibidora da PKC, no aumento da atividade locomotora induzida pela anfetamina;
5. Avaliar o efeito da medroxiprogesterona, um antiestrogênico, no aumento da atividade locomotora induzida pela anfetamina;
6. Avaliar o efeito do clomifeno, um antiestrogênico e inibidor da PKC, no aumento da atividade locomotora induzida pela anfetamina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso entre 40 e 60 gramas, nascidos e criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (21 ± 1 ° C); ciclo claro-escuro de 12 horas, comida e água à vontade. Todos os experimentos foram realizados no período entre 8 e 13 h. Os animais foram transferidos para sala de aclimação do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central do Departamento de Farmacologia da UFPR uma semana antes dos experimentos. Nos dias de experimentos, os animais foram aclimatados por uma hora na sala experimental.

3.2. Drogas e Tratamento

- DL-anfetamina sulfato (SIGMA Co., E.U.A) 3mg/kg (veículo: salina) – dose única intraperitoneal;
- Carbonato de Lítio (EUROFARMA, Brasil) 100 e 150mg/kg (veículo: salina) – dose única subcutânea;
- Acetato de Medroxiprogesterona (PHARMA NOSTRA, Brasil) 1, 3 e 6mg/kg (veículo: salina) – dose única subcutânea;
- Citrato de tamoxifeno (SIGMA Co, E.U.A) 1mg/kg (veículo: óleo de canola) – dose única subcutânea;
- Clomifeno (MEDLEY, Brasil) 15, 30 e 45mg/kg (veículo: salina) – dose única subcutânea;
- Queleritrina (ALOMONE LABS, Israel) 1µg/animal (veículo: água destilada e salina) – dose única intracerebroventricular.

Na administração do Lítio foi necessário fazer a correção do pH, pois a solução original se encontrava muito básica. Essa correção foi feita nos experimentos com adição de HCl 2N até que se atingisse um pH próximo a 7,4 (pH fisiológico).

A preparação da queleritrina para administração i.c.v. foi feita da seguinte maneira: (1) Dissolveu-se 1mg de queleritrina em 0,2ml de água destilada (no frasco original da droga); (2) Diluiu-se a solução-mãe em solução salina 0.9% para 2ml; (3) Administrou-se 2µl da solução preparada, ou seja, 1µg de queleritrina. A solubilidade da queleritrina é de 10mg em 1ml de água destilada.

Na 1ª etapa dos experimentos foi determinado o melhor intervalo de tempo entre a administração de anfetamina e o teste comportamental, os grupos foram constituídos por diferentes animais distribuídos em: anfetamina (3 mg/kg) e salina testados no tempo 0, 20, 40 e 60 min após a administração da anfetamina.

TABELA 1- GRUPOS FORMADOS PARA AS ETAPAS 2 E 3 (N= 4 A 15 CAMUNDONGOS/GRUPO)

Etapa 2			
Lítio 100 mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3 mg/kg, ip)
150 mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3 mg/kg, ip)
Veículo	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Etapa 3			
Tamoxifeno 1mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3 mg/kg, ip)
Tamoxifeno 0,5mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Veículo	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Queleritrina 1 µg/animal	icv	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3 mg/kg, ip)
Veículo	icv	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Medroxiprogesterona 1mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Medroxiprogesterona 3mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Medroxiprogesterona 6mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Veículo	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Clomifeno 15mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Clomifeno 30mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Clomifeno 45mg/kg	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)
Veículo	sc	+ Salina (ip)	ou anfetamina (3mg/kg, ip)

3.3. Teste de locomoção – caixa de movimentação espontânea

A atividade locomotora foi medida em uma caixa de madeira (40 x 20 x 26cm), com chão de tela de arame, equipada com três sensores fotoelétricos no seu interior, com uma distância de 10cm de uma célula a outra (CAMARINI *et al.*, 1995).

Os experimentos foram realizados em três dias consecutivos, sendo os dois primeiros dias apenas para habituação do animal à caixa de movimentação (sem administração de droga), pelo tempo de 20 minutos cada dia. No dia do teste, os animais foram tratados com as drogas experimentais ou seus veículos, e depois de 15 minutos tratados com anfetamina (3mg/kg) ou seu veículo. Após um período de 20 minutos da administração de anfetamina (o tempo escolhido para a realização dos testes, figura 1), os animais foram colocados individualmente nas caixas de movimentação por 20 minutos e o número de cruzamentos pelos sensores fotoelétricos foi registrado. Ao término deste tempo, os animais foram retirados das caixas e retornaram para a gaiola. O número de cruzamentos foi considerado com índice de atividade locomotora, sendo seu aumento após anfetamina indicativo de efeito excitatório. Um bloqueio do efeito excitatório da anfetamina foi considerado indicativo de efeito antimaníaco; entretanto, um efeito positivo neste modelo foi considerado apenas quando a dose da substância testada (p.ex. lítio) não alterou a atividade motora na ausência da administração de anfetamina (p.ex. redução da locomoção do grupo lítio + salina em comparação com o grupo veículo + salina).

Após a determinação do melhor período de tempo para o teste com a administração de anfetamina, foi feita a validação do método com a administração de carbonato de lítio 15 min antes da administração de anfetamina. Posteriormente foram testadas as drogas inibidoras da PKC (tamoxifeno e queleritina), seguido da medroxiprogesterona com ações somente antiestrogênica. O clomifeno, com perfil de ação similar ao do tamoxifeno, também foi utilizado.

Para a administração de queleritina ou seu veículo, os animais foram previamente sedados com éter a fim de facilitar a administração da droga.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Como os dados tiveram heterogeneidade de variância, ou seja, não tinha homocedasticidade, foram transformados para seu logaritmo natural, obtendo desta forma homocedasticidade e distribuição normal. Os resultados logarítmicos foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste post-hoc de Newmann-Keuls.

O intervalo de tempo entre a administração de anfetamina e a avaliação da atividade locomotora foi analisado por ANOVA de duas vias (tratamento como um fator e tempo depois da administração como outro fator) seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. Alguns experimentos foram realizados em dias diferentes, para completar o número de animais em cada grupo ou testar diferentes doses. Quando os grupos controles (veículo-salina) não apresentavam diferença significativa entre eles, os dados foram agrupados e foi feita uma única análise. Este é o caso dos experimentos com o intervalo de tempo da anfetamina, com o lítio, com a medroxiprogesterona e com o clomifeno. Os resultados destas análises foram idênticos aos das análises individuais (conduzidas em cada dia experimental). Por outro lado, os experimentos com as doses de tamoxifeno apresentaram diferença entre os grupos controles dos dois dias, então os dados foram analisados e apresentados separadamente. Todas as análises foram feitas com o GraphPad Prism version 3.00 para Windows (GraphPad Software, EUA). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Influência do intervalo de tempo entre a administração de anfetamina e avaliação da atividade locomotora (FIGURA 1)

ANOVA indicou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(1,36) = 29.78$, $P < 0.0001$] e interação entre tratamento e tempo $F(3,36) = 5.367$, $P < 0.01$] mas não para o fator tempo [$F(3,36) = 1.946$, NS]. As comparações post-hoc mostraram aumento da atividade locomotora em camundongos tratados com anfetamina nos tempos 0 e 20 ($p < 0.01$ nos dois casos), mas não em 40 e 60 minutos (figura 1). Baseado nestes dados, foi escolhido o intervalo de 20 minutos para os experimentos seguintes.

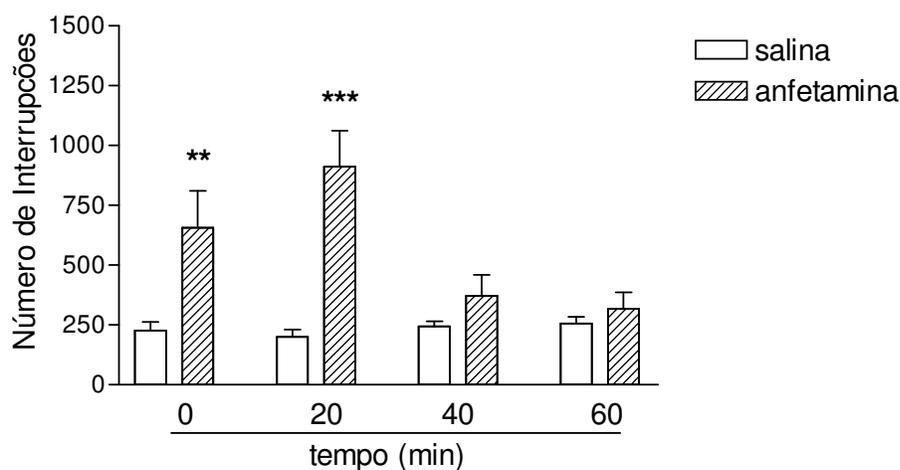


FIGURA 1. Influência do intervalo de tempo entre a administração de anfetamina (3 mg/kg, sc) e o teste de locomoção, analisado em uma caixa de movimentação espontânea durante 20 minutos. O eixo y representa o número de vezes que os animais passaram através de qualquer uma das células fotoelétricas instaladas na caixa. Os dados representam media + EPM, n = 4-5/grupo.

** $P < 0,01$ e *** $P < 0.001$ comparado ao grupo salina no mesmo intervalo de tempo.

5.2. Efeito do carbonato de lítio sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina (FIGURA 2)

ANOVA indicou que houve um efeito significativo do tratamento [$F(5,30) = 3,737$, $P < 0.01$], com um aumento na locomoção com veículo + anfetamina comparado aos outros grupos (todos $P < 0.05$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre o grupo controle (veículo + salina) e os grupos tratados com lítio (nas duas doses, tanto com salina, quanto com anfetamina). Então, o lítio bloqueou a hiperlocomoção produzida pela anfetamina, e, além disso, não prejudicou a atividade locomotora normal dos grupos tratados com lítio + salina, nas duas doses.

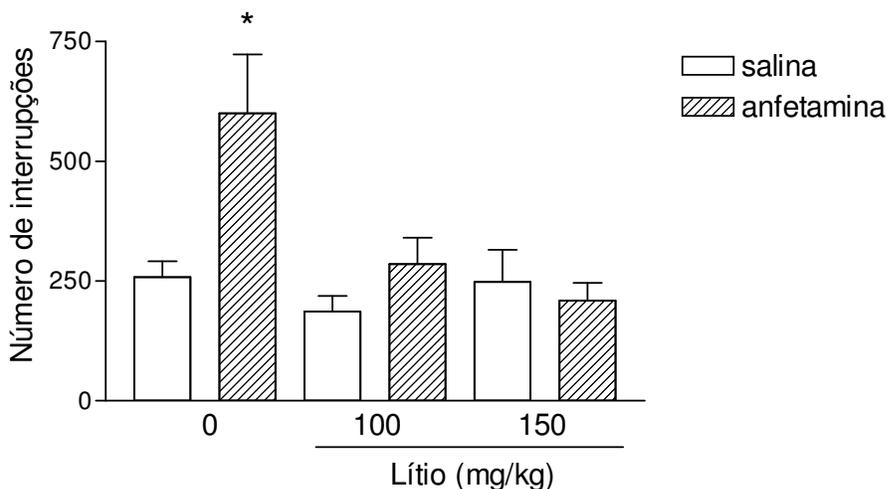


FIGURA 2. Efeitos de uma injeção de Lítio (100mg/kg e 150mg/kg, s.c.) sobre o comportamento de hiperlocomoção induzido por uma injeção de anfetamina (3mg/kg, i.p.), analisado na caixa de movimentação espontânea. O eixo y representa o número de vezes que os animais passaram através de qualquer uma das células fotoelétricas instaladas na caixa. Os dados representam a média + EPM (n= 6/ grupo).

* $P < 0,05$ em relação aos outros grupos.

5.3. Efeito do tamoxifeno sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina (FIGURA 3)

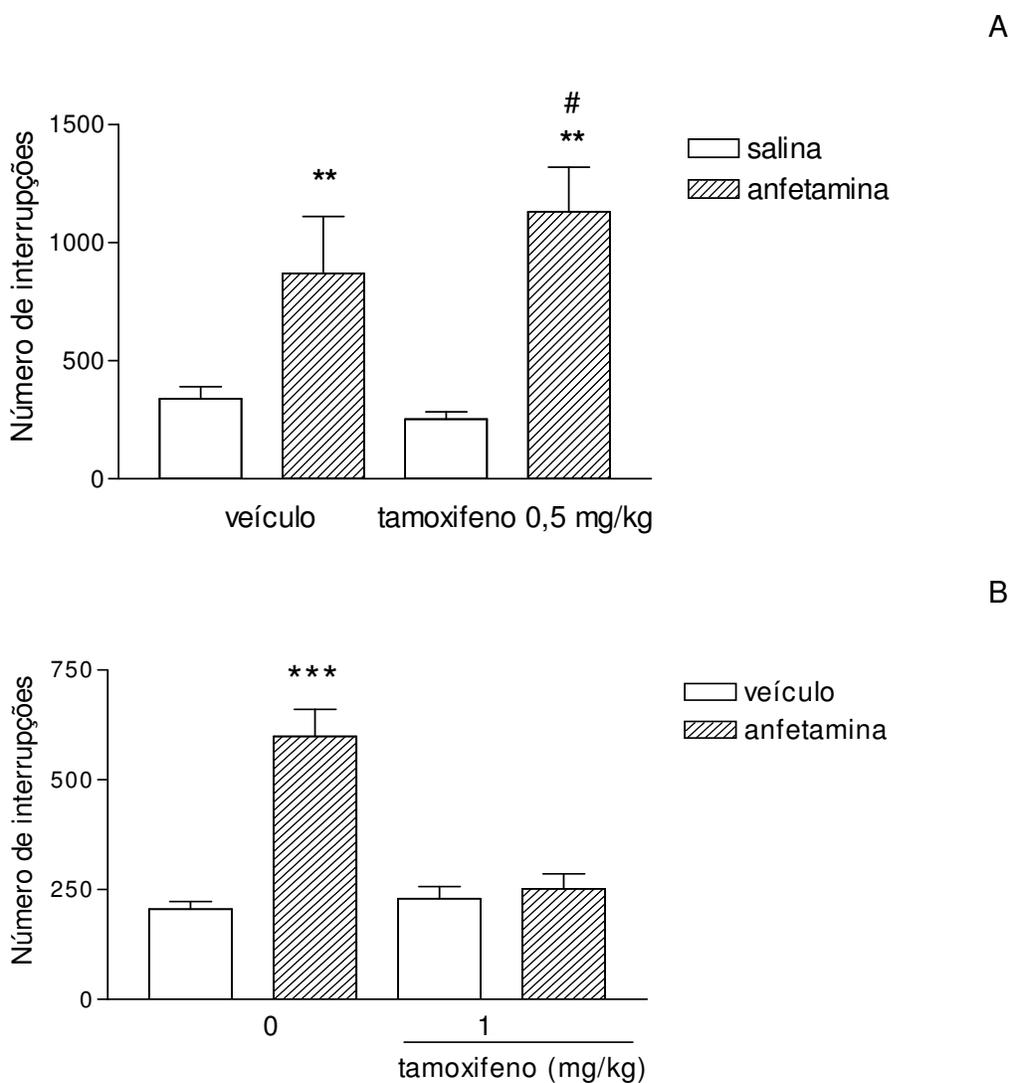


FIGURA 3. Efeitos de uma injeção de tamoxifeno (0,5 ou 1 mg/kg s.c.; A e B respectivamente) sobre o comportamento de hiperlocomoção induzido por uma injeção de anfetamina (3mg/kg, i.p.), analisado na caixa de movimentação espontânea. O eixo y representa o número de vezes que os animais passaram através de qualquer uma das células fotoelétricas instaladas na caixa. Os dados representam a média + EPM (n= 6).

** P < 0,01 e *** P < 0,001 em relação aos grupos tratados com veículo

P < 0,05 em relação ao grupo salina + tamoxifeno.

Tamoxifeno 0.5 mg/kg (Fig 3A)

Houve um efeito significativo do tratamento [$F(3, 20) = 12.87, P < 0.0001$], com veículo + anfetamina e tamoxifeno 0,5 mg/kg + anfetamina aumentando a atividade locomotora em relação aos respectivos grupos controles (veículo ou tamoxifeno 0,5 mg/kg + salina; $P < 0.01$ nos dois casos). Além disso, houve diferença significativa entre o grupo veículo + salina e tamoxifeno 0,5 mg/kg + anfetamina ($P < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os grupos veículo + anfetamina e tamoxifeno 0,5 mg/kg + anfetamina. Então, tamoxifeno 0,5 mg/kg não mostrou efeito sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.

Tamoxifeno 1.0 mg/kg (Fig 3B)

Houve um efeito significativo do tratamento [$F(3, 20) = 13.75, P < 0.001$], com veículo + anfetamina aumentando a locomoção em relação aos outros grupos (em todos, $P < 0.001$). Não houve diferença significativa entre o grupo veículo + salina e os grupos tratados com tamoxifeno 1,0 mg/kg, tanto com salina quanto com anfetamina. Então, o tamoxifeno, nesta dose, bloqueou a hiperlocomoção induzida pela anfetamina e não prejudicou a atividade locomotora dos animais não tratados com anfetamina.

5.4. Efeito da queleritrina sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina (FIGURA 4)

Houve um efeito significativo do tratamento [$F(3, 14) = 47.56, P < 0.001$] com veículo + anfetamina aumentando a locomoção em relação aos outros grupos (em todos, $P < 0.001$). Não houve diferença significativa entre o grupo veículo + salina e

os grupos tratados com queleritrina (tanto com veículo quanto com anfetamina). Então, a queleritrina bloqueou a hiperlocomoção induzida pela anfetamina e não prejudicou a atividade locomotora normal dos animais não tratados com anfetamina.

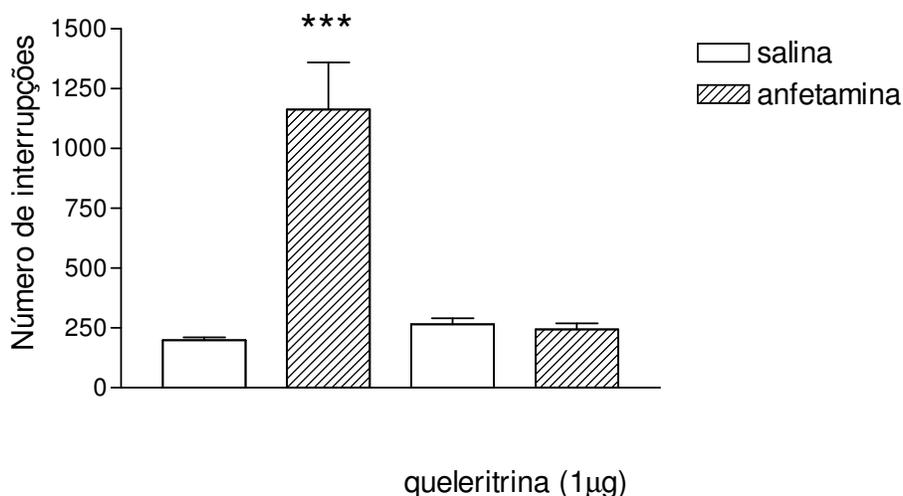


FIGURA 4. Efeitos de uma injeção de queleritrina 1µg/animal sobre o comportamento de hiperlocomoção induzido por uma injeção de anfetamina (3mg/kg), analisado na caixa de movimentação espontânea. O eixo y representa o número de vezes que os animais passaram através de qualquer uma das células fotoelétricas instaladas na caixa. Os dados representam a média + EPM (n= 4-5/ grupo).

*** P < 0,001 em relação aos outros grupos

5.5. Efeito do clomifeno sobre a hiperlocomoção produzida pela anfetamina (FIGURA 5)

Houve um efeito significativo do tratamento [F(7, 51) =81.69, P<0.0001]. A análise post-hoc mostrou uma diferença significativa entre os grupos tratados com anfetamina, independentemente dos pré-tratamentos (veículo ou clomifeno 15, 30 ou

45 mg/kg), e seus respectivos controles tratados com salina (em todos $P < 0.001$). Não houve diferença significativa entre o grupo veículo + salina e os grupos clomifeno + salina em nenhuma das doses de clomifeno testadas, nem entre o grupo veículo + anfetamina e clomifeno + anfetamina em nenhuma das doses de clomifeno. Finalmente, houve uma diferença entre o grupo veículo + salina e os grupos clomifeno (em todas as doses) + anfetamina ($P < 0.001$). Então, o clomifeno não bloqueou a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.

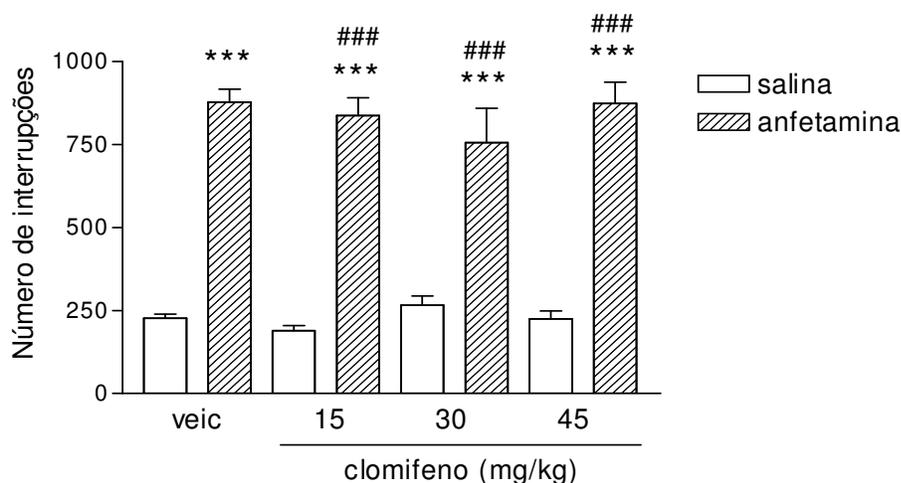


FIGURA 5. Efeitos de uma injeção de clomifeno (15, 30 ou 45 mg/kg, s.c.) sobre o comportamento de hiperlocomoção induzido por uma injeção de anfetamina (3mg/kg, i.p.), analisado na caixa de movimentação espontânea. O eixo y representa o número de vezes que os animais passaram através de qualquer uma das células fotoelétricas instaladas na caixa. Os dados representam a média + EPM (n= 15-4/ grupo).

*** $P < 0,001$ em relação ao grupo veículo + salina

$P < 0,001$ em relação ao respectivo controle (clomifeno 15, 30 ou 40 + salina)

5.6. Efeito da medroxiprogesterona sobre a hiperlocomoção produzida pela anfetamina (FIGURA 6)

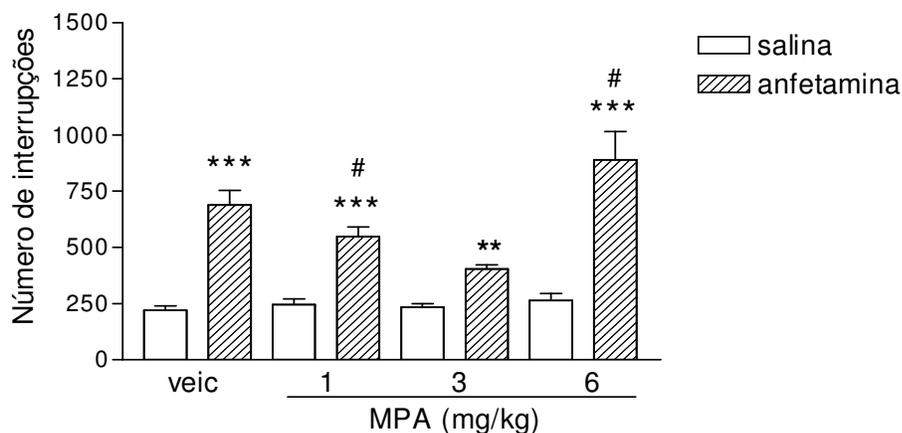


FIGURA 6. Efeitos de uma injeção de medroxiprogesterona (1, 3 e 6mg/kg) sobre o comportamento de hiperlocomoção induzido por uma injeção de anfetamina (3mg/kg), analisado na caixa de movimentação espontânea. O eixo y representa o número de vezes que os animais passaram através de qualquer uma das células fotoelétricas instaladas na caixa. Os dados representam a média + e.p.m (n= 5).

** P < 0,01 em relação ao grupo veículo + salina

*** P < 0,001 em relação ao grupo veículo + salina

P < 0,05 em relação ao respectivo controle

Houve um efeito significativo do tratamento [$F(7, 48) = 24,06, P < 0.0001$]. A análise post-hoc mostrou uma diferença significativa entre os grupos tratados com anfetamina, independentemente do pré-tratamento com (veículo ou 1 ou 6 mg/kg) e seus respectivos controles tratados com salina (em todos, $P < 0.001$). No entanto, não houve diferença significativa entre o grupo veículo + medroxiprogesterona 3 mg/kg com o grupo anfetamina + medroxiprogesterona 3 mg/kg, mas houve diferença significativa entre este último e o grupo veículo + salina ($P < 0.01$). Não houve diferença significativa entre o grupo veículo + salina e os grupos

medroxiprogesterona (1, 3 ou 6 mg/kg) + salina, nem entre o grupo veículo + anfetamina e os grupos medroxiprogesterona (1 ou 6 mg/kg) + anfetamina. Então, somente a dose intermediária de medroxiprogesterona reduziu a hiperlocomoção induzida pela anfetamina.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

O principal resultado do presente estudo foi o efeito tipo antimaníaco do tamoxifeno na hiperlocomoção induzida pela anfetamina, um modelo de mania. Adicionalmente, observou-se que a queleritrina, uma droga inibidora da PKC, também reverte este efeito, enquanto que a medroxiprogesterona, uma droga antiestrogênica, em uma dose apenas, parcialmente reduz a hiperlocomoção induzida pela anfetamina. É importante ressaltar que estes resultados foram obtidos em doses que isoladamente não alteram a atividade locomotora. Estes dados sugerem que o efeito do tamoxifeno sobre a hiperlocomoção produzida pela anfetamina se dá, principalmente, pela sua ação inibidora da proteína quinase C sem prejudicar a locomoção normal dos animais que receberam apenas queleritrina e não anfetamina.

Os resultados deste trabalho são consistentes também com resultados obtidos em outros trabalhos que demonstram a eficácia de inibidores de proteína quinase C atenuando a resposta da anfetamina (BROWMAN *et al*, 1998; EINAT *et al*, 2004; EINAT *et al* 2007), particularmente em relação ao tamoxifeno (EINAT *et al*, 2007). Por exemplo, o efeito observado com a administração de queleritrina no presente estudo pode ser comparado aos resultados obtidos com um outro inibidor da PKC, Ro31-8220, que administrado no núcleo accumbens, atenuou a resposta motora produzida pela anfetamina, efeito que foi associado com o bloqueio da liberação de DA induzido pela anfetamina (BROWMAN *et al*, 1998).

É importante considerar, entretanto, que o mecanismo de ação do tamoxifeno, droga testada neste estudo, não se restringe apenas à inibição da PKC. Como é também um modulador de receptores estrogênicos, seus efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos poderiam contribuir para alterações comportamentais. Para isso, foi utilizada também a medroxiprogesterona, uma progestina com ação antiestrogênica. Em experimentos com a medroxiprogesterona, foi observado que na dose intermediária utilizada houve um bloqueio parcial da hiperlocomoção produzida pela anfetamina, sugerindo que o mecanismo anti-estrogênico de drogas pode provocar um efeito anti-maníaco, podendo ter contribuído para o efeito do tamoxifeno. Entretanto, este efeito foi discreto e limitado, não reproduzindo totalmente o efeito do tamoxifeno. Este resultado reproduz o observado na clínica por Kulkarni *et al.* (2006), que observaram uma redução

significativa dos sintomas maníacos com a medroxiprogesterona, mas inferior a encontrada com tamoxifeno. Embora o efeito antiestrogênico possa ser uma linha de pesquisa de novos tratamentos para o transtorno afetivo bipolar, ele não explica totalmente os efeitos do tamoxifeno.

O resultado com o clomifeno é um pouco intrigante, uma vez que esta droga apresenta efeito antiestrogênico e inibidor da PKC, devendo, em teoria, apresentar padrão de resposta similar ao tamoxifeno. Uma possível explicação seria uma diferença na farmacocinética destas drogas: embora um dos sítios de ação propostos para o clomifeno seja o hipotálamo, o que indica sua penetração no SNC, pode ser que a sua administração subcutânea em camundongos não acarrete níveis centrais ótimos para inibição da PKC. Esta hipótese deve ser testada em estudos posteriores com administração icv do clomifeno. Considerando as diferenças entre os subtipos de PKC e suas localizações citadas anteriormente, outra hipótese seria a de que o clomifeno apresente diferença em relação ao tamoxifeno em relação a sua atividade inibitória sobre a PKC. É curioso que na clínica ginecológica estas duas drogas apresentem diferentes indicações (clomifeno para infertilidade e tamoxifeno para câncer de mama) e que os pesquisadores que avaliaram o tamoxifeno em pacientes maníacos reiteradamente afirmam ser o único inibidor da PKC que atinge o SNC e está disponível para uso clínico (BEBCHUK *et al.*, 2000; ZARATE *et al.*, 2007).

A validade destas considerações é dependente da validade do modelo empregado. Como descrito anteriormente, o modelo das alterações comportamentais induzidas pela anfetamina tem sido considerado um modelo com boa validade preditiva (sensível a drogas antimaníacas), de constructo (participação dos sistemas monoaminérgicos nos quadros maníacos) e de face (similaridades comportamentais, tais como hiperlocomoção, comportamento de risco, etc.). Em particular, a hiperlocomoção induzida pela anfetamina parece preencher vários destes critérios. A hiperlocomoção induzida por anfetamina é bloqueada por lítio (GOULD *et al.*, 2001; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004; EINAT, 2005). Além disto, este comportamento parece estar relacionado à neurotransmissão dopaminérgica no núcleo accumbens, uma vez que a destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos reduz drasticamente este efeito da anfetamina (KELLY & IVERSEN, 1976). Em relação à validade de face, os comportamentos induzidos pela anfetamina assemelham-se aos observados nos estados maníacos, particularmente

em relação à hiperlocomoção, distraibilidade, comportamento de risco e redução do sono (EINAT, 2006). Além disto, em humanos a administração de anfetamina induz, entre outros sintomas, sensação de bem estar e euforia (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004). Entretanto, uma lacuna neste modelo é a falta da avaliação de drogas ineficazes na clínica (p.ex. buspirona ou antidepressivos sedativos), o que diminui sua validade preditiva.

Como dito anteriormente, o tamoxifeno é uma droga amplamente usada apenas no tratamento do câncer de mama, e seus efeitos demonstrados até agora em estudos clínicos com pacientes maníacos foram promissores. No entanto, nestes estudos clínicos não foi possível corroborar a proposta da mediação da inibição da PKC no efeito antimaniaco do tamoxifeno, o que demonstra a importância deste estudo com um modelo animal sem estas interferências.

Sabe-se que uma parcela de pacientes com o quadro maníaco-depressivo responde parcialmente (ou não responde) aos tratamentos já existentes, ou são intoleráveis aos seus efeitos colaterais com os estabilizadores de humor (lítio e anticonvulsivantes), dificultando a adesão ao tratamento. A confirmação da eficácia do tamoxifeno para esta indicação oferece uma possível alternativa de tratamento para esta doença. Mais ainda, a hipótese de que seu mecanismo de ação antimaniaco seja através da via de sinalização da proteína quinase C, possibilita o desenvolvimento e a utilização de novas drogas mais específicas que ofereçam uma solução mais rápida e adequada para pacientes que apresentam o transtorno afetivo bipolar.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. C.; SOUZA, D. G.; SOLETTI, R. C.; LÓPEZ, M. G.; RODRIGUES, A. L. S.; GABILAN, N. H. Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. **Neuroscience Letters** 2006; 395: 93-97.

BALTUCH, G. H.; COULDWELL, W. T.; VILLEMURE J. G.; YONG V. W. Protein kinase C inhibitors suppress cell growth in established and low-passage glioma cell lines: a comparison between staurosporine and tamoxifen. **Neurosurgery** 1993; 33: 495-501.

BEBCHUK, J. M.; ARFKEN, C. L.; DOLAN-MANGI, S.; MURPHY, J.; HASANAK, K.; MANJI, H. K. A preliminary investigation of a protein kinase C inhibitor in the treatment of acute mania. **Archives of General Psychiatry** 2000; 57: 95-97.

BOWDEN, C.L. Pharmacological treatment of bipolar disorder: a review. In: Maj, M., Akiskal, H.S., Lopez-Ibor, J.J., Sartorius, N. (Eds.), *Bipolar Disorders*. WPA Series: **Evidence and Experience in Psychiatry** 2002; vol 5. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 191-277.

BROWMAN, K. E.; KANTOR, L.; RICHARDSON, S.; BADIANI, A.; ROBINSON, T. E.; GNEGY, M. E. Injections of protein kinase C inhibitor Ro31-8220 into the nucleus accumbens attenuates the acute response to amphetamine: tissue and behavior studies. **Brain Research** 1998; 814: 112-119.

BRUNELLO, N. Mood stabilizers: protecting the mood...protecting the brain. **Journal of Affective Disorders** 2004; 79: 15-20.

BRUNELLO, N.; TASCEDDA, F. Cellular mechanisms and second messengers: relevance to the psychopharmacology of bipolar disorders. **International Journal of Neuropsychopharmacology** 2003; 6: 181-189.

CAMARINI, R.; ANDREATINI, R.; MONTEIRO, M. G. Prolonged treatment with carbamazepine increases the stimulatory effects of ethanol in mice. **Alcohol**. 1995;12(4):305-8.

CLARKE, R.; LEONESSA, F.; WELCH, J. N.; SKAAR, T. C. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. **Pharmacological Reviews** 2001; 53(1):25-71.

DAVIS, M. E.; PATRICK, R. L. Diacylglycerol-induced stimulation of neurotransmitter release from rat brain striatal synaptosomes. **Journal of Neurochemistry** 1990; 54: 662-668.

EDASHIGE, K.; SATO, F. E.; Akimaru, K.; Yoshioka, T.; Utsumi, K. Nonsteroidal antiestrogen suppresses protein kinase C – its inhibitory effect on interaction of substrate protein with membrane. **Cell Structure and Function** 1991; 16: 273-281.

EINAT, H.; YUAN, P.; SZABO, S.; DOGRA, S.; MANJI, H. K. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. **Neuropsychobiology** 2007; 55: 123-131.

EINAT, H. Modelling facets of mania – new directions related to the notion of endophenotypes. **Journal of Psychopharmacology** 2006; 20(5): 714-722.

EINAT, H. Different behaviors and different strains: Potential new ways to model bipolar disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 2007. 31(6), 850-857.

EINAT, H.; CHEN, G.; MANJI, H. K. Possible involvement of protein kinase C (PKC) in bipolar disorder and its treatment. **Harefuah** 2004; 143: 420-425.

FRIEDMAN, E.; HOAU, Y. W.; LEVINSON, D.; CONNELL, T. A.; SINGH, H. Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. **Biological Psychiatry** 1993; 33: 520-525.

GOULD, T. J.; KEITH, R. A.; BHAT, R. V. Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine-induced open-field in two inbred strains of mice. **Behavior Brain Research** 2001; 118: 95-105.

HAHN, C. G.; FRIEDMAN, E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. **Bipolar disorders** 1999; 2: 81-86.

KANTOR, L.; GNEGY, M. E. Protein kinase C inhibitors block amphetamine-mediated dopamine release in rat striatal slices. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 1998; 284: 594-598.

KATO, T.; KUBOTA, M.; KASAHARA, T. Animal models of bipolar disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2007; 31(6), 832-842.

KECK, JR. P. E.; MANJI, H. K. Current and emerging treatments for acute mania and long-term prophylaxis for bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress**. 2002, 1109 – 1118.

KELLY, P. H.; IVERSEN, S. D. Selective 6-OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. **European Journal of Pharmacology**. 1976 Nov;40(1):45-56.

KULKARNI, J.; GARLAND, K. A.; SCAFFIDI, A.; HEADEY, A.; ANDERSON, R.; CASTELLA, A.; FITZGERALD, P.; DAVIS, S. R. A pilot estudy of hormone modulation as a new treatment for mania in women with bipolar affective disorder. **Psychoneuroendocrinology** 2006; 31: 543-547.

LONDON, S. N.; YOUNG, D.; CALDITO, G.; MAILHES, J. B. Clomiphene citrate-induced perturbations during meiotic maturation and cytogenetic abnormalities in mouse oocytes in vivo and in vitro. **Fertility and Sterility** 2000; 73; 3:620-626.

MACHADO-VIEIRA, R.; KAPCZINSKI, F.; SOARES, J. C. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 2004 Mar;28(2):209-24.

MANJI, H. K.; CHEN, G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. **Molecular Psychiatry**. 2002; 7 Suppl 1: S46-56.

MANJI, H. K.; LENOX, R. H. Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. **Biological Psychiatry** 1999; 46: 1328-1351.

MANJI, H. K.; LENOX, R. H. Lithium: a unique cation in biology and medicine. **Neuropsychopharmacology** 1998; 19: 161-240.

RIGGINS, R. B.; SCHERECENGOST, R. S.; GUERRERO, M. S.; BOUTON, A. H. Pathways to tamoxifen resistance. **Cancer Letters** 2007; 256: 1-24

WANG, H. Y.; FRIEDMAN, E. Lithium inhibition of protein kinase C activation-induced serotonin release. **Psychopharmacology** 1999; 213-218.

WANG HY, FRIEDMAN E. Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorders brains. **Biological Psychiatry** 1996; 40: 568-575.

YILDIS-YESILOGLU, A. Targeted treatment strategies in mania: anti-manic effects of a PKC inhibitor tamoxifen. **Biological Psychiatry** 2007; 61: 1S-266S.

ZARATE, JR. C. A.; SINGH, J. B.; CARLSON, F. J.; QUIROZ, J.; JOLKOVSKY, L.; LUCKENBAUGH, D. A.; MANJI, H. K. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. **Bipolar Disorders** 2007; 9: 561-570.