

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELA PEREIRA

**Avaliação do efeito tipo antidepressivo e  
antimaníaco da miricitrina em testes animais**

**CURITIBA**

**2013**

MARCELA PEREIRA

**Avaliação do efeito tipo antidepressivo e  
antimaníaco da miricitrina em testes animais**

Tese de doutorado em Farmacologia,  
curso de Pós-graduação em Farmacologia  
do Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Roberto Andreatini


**CURITIBA**

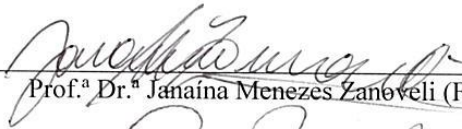
**2013**



1                   **ATA DO JULGAMENTO DA 21ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

2           Ao vigésimo quinto dia do mês de julho do ano de dois mil e treze, às treze horas e  
3 trinta minutos, no Anfiteatro nº 05 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade  
4 Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado do Programa  
5 de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria da pós-graduanda **MARCELA**  
6 **PEREIRA**, intitulada "Avaliação do efeito tipo antidepressivo e antimaníaco da miricitrina  
7 em testes animais", sob orientação do Prof. Dr. Roberto Andreatini e banca composta pelos  
8 professores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Menezes Zanoveli (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr.  
9 Reinaldo Naoto Takahashi (Farmacologia - UFSC), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roseli Boerngen de Lacerda  
10 (Farmacologia – UFPR), e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rúbia Maria Monteiro Weffort Oliveira (Farmácia e  
11 Farmacologia – UEM). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos e a candidata teve  
12 quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida  
13 durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para  
14 responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte  
15 parecer: APROVADA. De acordo com o Regimento Interno do Programa  
16 de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação o  
17 trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador.  
18 Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a  
19 presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais membros da banca  
20 examinadora, em Curitiba, 25 de julho de 2013.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto Andreatini (Presidente - Farmacologia - UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Janaina Menezes Zanoveli (Farmacologia – UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi (Farmacologia - UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Roseli Boerngen de Lacerda (Farmacologia – UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Rúbia Maria Monteiro Weffort Oliveira (Farmácia e Farmacologia – UEM)

*Serei eternamente grata...*

*A Deus primeiramente por sempre estar presente em minha vida, me guiar, me iluminar e sempre cuidar de mim. Por ser tão maravilhoso sempre e me tomar pela mão e me guiar no meu caminho, me dando sempre muito mais do que eu poderia imaginar e com certeza mais do que eu mereço.*

*Ao professor Roberto Andreatini, pelo tanto que me ensinou ao longo destes anos, pela orientação em toda a minha vida científica e por ser tão bom mestre, sempre atencioso e amigo. Obrigada pela amizade, apoio incondicional e confiança depositada em mim nestes sete anos, sendo com certeza o responsável pela minha opção pela pesquisa! Obrigada por tudo!*

*Aos meus pais, os melhores pais que alguém poderia ter. Obrigada pai e obrigada mãe. Vocês são um exemplo de vida para mim. Sempre sábios e tão batalhadores. Ao meu irmão, Felipe, que apesar das brigas e desentendimentos é um ótimo irmão e um exemplo de esforço e dedicação. À minha avó e a minha tia Débora e prima Lídia, que sempre se preocuparam comigo e me apoiaram durante toda a minha vida. Também a todos os meus outros familiares, que sempre me desejaram o melhor e os quais eu sempre pude contar. Amo vocês.*

*Aos amigos que tive a sorte de conhecer e conviver diariamente no departamento de farmacologia, Francislaine, Gracianne, Suellen, Etiéli, Hellen, Bruno, Daniel, Mariza, Janaína, Isadora, Sílvia, Eli, Patrícia, D. Dolores. Especialmente a Isadora, que além de amiga trabalhou comigo durante todo o meu doutorado, auxiliando durante toda a realização deste trabalho. Ao pessoal da Alemanha, que foram como uma família durante a minha estada lá, Özge, professor Rainer, Juan e Dominik.*

*Aos professores, Janaína, Adair, Roseli, Alexandra, Alex e Paulo que sempre foram bons comigo e me ensinaram muito durante este período, vocês são exemplos de bons professores.*

*Aos meus amigos Dani, Pandora, Vanderson, Renata Fiusa, Yuri, Renata Souza, Renata, Jéssica, Hugo, Kirk, Adann, Gus, Alexandre, Yuri, Juliana, Patrícia, Carla, que foram minhas companhias para momentos de diversão. Sentirei muita falta de vocês nessa nova fase da minha vida e espero que nossa amizade dure para sempre, apesar da distância.*

***Não por força, nem por violência, mas pelo  
meu Espírito, diz o SENHOR dos exércitos.  
(Zacarias 4:6)***

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Transtorno de humor bipolar (THB).....	1
1.2. Teorias neurobiológicas da mania.....	5
1.2.1. Modelos animais no estudo da mania.....	8
1.3. Teorias neurobiológicas da depressão.....	10
1.3.1. Modelos animais no estudo da depressão.....	15
1.4. Tratamento farmacológico do THB.....	17
1.5. Miricitrina.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 ANIMAIS.....	22
3.1.1 Ratos.....	22
3.1.2 Camundongos.....	22
3.2 DROGAS E TRATAMENTOS.....	23
4 PRIMEIRA FASE: TESTES DE MANIA.....	23
4.1 Testes comportamentais.....	23
4.1.1 Teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina.....	23
4.1.2 Teste de hiperlocomoção induzida por privação de sono.....	24
4.1.3 Análise da reversão das alterações na vocalização ultrasônica induzidas por anfetamina.....	25
4.2 Ensaio neuroquímico.....	27
4.2.1 Análise da atividade da miricitrina, lítio e tamoxifeno no ensaio do DPPH.....	27
4.2.2 Análise da estresse oxidativa (LPO) no hipocampo após teste comportamental de mania.....	28
4.3 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS NOS TESTES DE MANIA.....	29
5.1 Testes comportamentais.....	29
5.1.1 Teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina.....	29
5.1.2 Teste de hiperlocomoção induzida por privação de sono.....	29

5.1.3	Teste de vocalização ultrasônica induzida por anfetamina em ratos.....	30
5.2	Ensaio neuroquímico.....	34
5.2.1	Análise da atividade da miricitrina no ensaio do DPPH.....	34
5.2.2	Análise do estresse oxidativo (LPO) no hipocampo após teste comportamental de mania induzido por privação de sono.....	34
6.	SEGUNDA FASE: TESTES DE DEPRESSÃO.....	36
6.1	Testes comportamentais.....	36
6.1.1	Anedonia induzida por estresse brando repetido e imprevisível.....	36
6.1.2	Teste de preferência de sacarose.....	37
6.1.3	Teste de campo aberto.....	38
6.1.4	Teste de nado forçado.....	39
6.1.5	Teste de suspensão pela cauda.....	39
6.1.6	Pesagem da glândula adrenal.....	40
6.2	Ensaio neuroquímico.....	40
6.2.1	Dosagens de monoaminas no estriado.....	40
6.2.2	Análise da alteração dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando.....	40
6.2.3	Análise do estresse oxidativo (GSH e LPO) no SNC após teste comportamental de depressão.....	41
6.3	Análise estatística.....	41
7.	RESULTADOS NOS TESTES DE DEPRESSÃO.....	42
7.1	Testes comportamentais.....	42
7.1.1	Teste de preferência de sacarose.....	42
7.1.2	Teste de campo aberto.....	44
7.1.3	Teste de nado forçado.....	44
7.1.4	Teste de suspensão pela cauda.....	45
7.1.5	Peso relativo da glândula adrenal de camundongos submetidos a estresse brando e repetido.....	46
7.2	Ensaio neuroquímico.....	47
7.2.1	Dosagens de monoaminas no estriado.....	47
7.2.2	Análise da alteração dos níveis em IL-6 e TNF- $\alpha$ no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando.....	47
7.2.3	Análise do estresse oxidativo (GSH e LPO) no SNC após teste comportamental de depressão.....	48
8	DISCUSSÃO.....	51
8.1	Mania.....	52
8.2	Depressão.....	56
8.3	Conclusões.....	61
9	REFERÊNCIAS.....	64
10	ANEXO 1- Certificado do CEUA .....	76

## Lista de abreviaturas

**5-HT** - Serotonina

**ACTH** - Hormônio adrenocorticotrófico

**APA** - Associação Psiquiátrica Americana

**BD** – Bipolar disorder

**BDNF** - Fator neurotrófico derivado do cérebro

**Ca<sup>2+</sup>** - Cálcio.

**CAT** - Catalase

**CID-10** – Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde, 10 Ed.

**COMT** – Catecol-A-metil-transferase

**CRH** - Hormônio liberador de corticotrofina

**DA** – Dopamina

**DAT** – transportador de dopamina

**DSM-V** - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edn.

**GABA** - ácido gama-aminobutírico

**GAP-43** - Proteína Associada ao Crescimento de 43 KDa.

**Glu** – glutamato

**GSH** – Glutathiona

**GST** - Glutathiona S-transferase

**HPA** – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

**HPLC** - High-performance liquid chromatography

**IP** – Via intra-peritoneal

**IMIP** - Imipramina

**IL (1 ou 6)** – interleucina 1 e interleucina 6

**K** - Potássio

**LPO** – Peroxidação lipídica

**MAO** – Monoamino oxidase

**LI** - Lítio

**MIR** – Miricitrina

**NA** - noradrenalina

**Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase** – bomba sódio potássio ATPase

**NMDA** - N-Metil-D-Aspartato.



**nREM** – sono não REM ou sincronizado

**nNOS** – Óxido nítrico sintase neuronal

**NO** – Óxido Nítrico

**PI** – Fosfatidil inositol

**PI3-K** - Fosfoinositol 3 quinase ou Proteína Quinase dependente de IP3.

**PKA** - Proteína Quinase dependente de AMPc.

**PKC** - Proteína Quinase dependente de Cálcio.

**SC** – Via subcutânea

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SOD** - Superóxido dismutase

**Tam** - Tamoxifeno

**THB** – Transtorno Afetivo Bipolar

**TrKB** - Receptor de fator neurotrófico tipo tirosina quinase

## Lista de figuras

<u>Figura 1:</u> Estrutura química da miricitrina.....	19
<u>Figura 2:</u> Esquema de teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina.....	24
<u>Figura 3:</u> Esquema do teste hiperlocomoção induzida por privação de sono.....	25
<u>Figura 4:</u> Tipos de vocalização de alta frequência (50kHz).....	26
<u>Figura 5:</u> Esquema de protocolo do teste de reversão das alterações na vocalização ultrasônica induzidas por anfetamina.....	27
<u>Figura 6:</u> Efeito do lítio (A); tamoxifeno (B) e miricitrina (C) na hiperlocomoção induzida por anfetamina.....	31
<u>Figura 7:</u> Efeito do lítio, tamoxifeno e miricitrina na (A) hiperlocomoção induzida por privação de sono (B) latência de sono após privação de sono.....	32
<u>Figura 8:</u> Efeito do lítio e tamoxifeno (A) e miricitrina (B) no aumento da vocalização apetitiva (50kHz) induzida por anfetamina.....	33
<u>Figura 9:</u> Efeito do lítio (A), tamoxifeno (B), miricitrina (C), água (controle negativo) e do ácido ascórbico (controle positivo) na atividade de sequestro de radicais livres pelo ensaio de DPPH.....	35
<u>Figura 10:</u> Efeito do lítio (100mg/kg); tamoxifeno (1mg/kg) e miricitrina (10mg/kg) na reversão da peroxidação lipídica causada por privação de sono.....	36
<u>Figura 11:</u> Esquema de bateria de estresse bando e subseqüente testes comportamentais.....	37
<u>Figura 12:</u> Estabelecimento de curva de preferência de solução de sacarose para determinação da melhor concentração a ser empregada (concentrações crescentes de 0,5-3,0%).....	42
<u>Figura 13:</u> Avaliação da indução da anedonia por estresse brando e repetido utilizando o teste de preferência de sacarose.....	43
<u>Figura 14:</u> Avaliação da reversão de anedonia induzida por estresse brando e repetido após tratamento com imipramina (20 mg/kg) ou miricitrina (10 mg/kg).....	43
<u>Figura 15:</u> Avaliação da atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando e repetido tratados com imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (20mg/kg).....	44
<u>Figura 16:</u> Avaliação do tempo de imobilidade no teste de nado forçado antes e após o tratamento dos animais com imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg).....	45
<u>Figura 17:</u> Avaliação do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando e repetido. Antes e após o tratamento dos animais com imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg).....	46

Figura18: Peso relativo da adrenal (proporção do peso em relação ao peso do corpo) em animais anedônicos versus controles após o tratamento com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina.....47

Figura 19: Quantificação dos níveis de serotonina (A), dopamina (B) e noradrenalina (C) no estriado de animais submetidos ao estresse brando e repetido e seus controles, após o tratamento com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg).....49

Figura 20: TNF- $\alpha$  e IL-6 em hipocampos de camundongos com anedonia induzida por estresse brando e repetido e controles após o tratamento com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg) por 14 dias.....50

Figura 21: GSH e LPO em cérebros de camundongos com anedonia induzida por estresse brando e repetido e controles após o tratamento com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg) por 14 dias.....51

## Resumo

O transtorno de humor bipolar (THB) é composto de três fases: depressiva, maníaca/hipomaníaca e eutímica (remissão de sintomatologia). Tem sido proposto que a inibição da PKC seja o mecanismo de ação comum de drogas estabilizadoras de humor e antimaníacas, dados estes observados em estudos com animais e na clínica. Por sua vez, tem sido proposto que a inibição do NO apresente efeito antidepressivo. Interessante notar que a inibição de NO tem sido associada a efeito antidepressivo em modelos animais, em que a diminuição da atividade nitrérgica no hipocampo se mostrou efetiva na reversão do comportamento depressivo. Por último é importante citar que em ambas as fases do THB, estudos têm mostrado um aumento do estresse oxidativo nos cérebros de animais após estes serem submetidos à indução de comportamento tipo maníaco ou depressivo e que o tratamento com fármacos diminui o estresse oxidativo.

A miricitrina é um flavonóide extraído de várias plantas (p.ex.: gênero *Eugênia*), que apresenta efeito antinociceptivo, de inibição da proteína quinase C (PKC) e a síntese da NO, além de um possível efeito antioxidante. Portanto, baseado nestas ações neuroquímicas da miricitrina, pode-se propor que esta possui potencial antimaníaco, antidepressivo e antioxidante.

Diante dos fatos acima citados, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito da miricitrina em modelos animais de mania (hiperlocomoção induzida por anfetamina ou por privação de sono e aumento no número de vocalizações de alta frequência pelo tratamento com anfetamina) e depressão (anedonia induzida por estresse brando e analisada por teste de preferência de sacarose, nado forçado e suspensão pela cauda). Inicialmente foi avaliado o efeito da administração de miricitrina nos testes comportamentais de mania e depressão e posteriormente, a partir dos resultados iniciais, buscou-se avaliar as alterações neuroquímicas decorrentes do tratamento com miricitrina, como: os níveis de monoaminas (e seus metabólitos), alterações nos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e estresse oxidativo nos animais.

Nossos dados sugerem que a miricitrina apresenta: (a) Efeito tipo antimaníaco (redução de hiperlocomoção induzida pela privação de sono e anfetaminas; redução de vocalizações ultrassônicas de alta frequência induzida por anfetamina e da latência do sono após a privação de sono), (b) antidepressivo (reversão da anedonia e diminuição de imobilidade no teste de natação forçada e a suspensão da cauda induzidas por estresse crônico e repetido), (c) efeito antioxidante (d) reversão do aumento na expressão de IL-6 induzida por estresse crônico e repetido (e) reversão da hipertrofia das adrenais induzido por repetido estresse. Portanto, a miricitrina mostrou efeitos comportamentais e neuroquímicos similares às drogas antimaníacas e antidepressivas, o que indica um bom potencial para o desenvolvimento de um novo tratamento para do transtorno bipolar.

## Abstract

The bipolar disorder (BD) is composed of three phases: depressive, manic / hypomanic and euthymic (remission of symptomology). It has been proposed that inhibition of PKC is the common mechanism of action of antimanic drugs and mood stabilizers (lithium and sodium valproate). In turn, it has been proposed that inhibition of NO may provide antidepressant effect, and the decrease in of nitrinergic activity in hippocampus has been effective in reversing depressive behavior. Finally it is important to mention that the manic and depressive phases have been associated with increased oxidative stress, and the same was observed in the induction of manic or depressive-like behavior in animals, which is reversed by treatment with antimanic and antidepressant drug.

Myricitrin is a flavonoid extracted from various plants (e.g. the genus *Eugenia*), which shows the analgesic effect and which inhibits NO and PKC synthesis. In addition, studies have shown a possible antioxidant effect. Therefore, based on the neurochemicals actions of myricitrin, it can be said, that this has a potential antimanic, antidepressant and antioxidant effect.

Considering the above mentioned, the present study aim was to evaluate the effect of myricitrin in animal models of mania (hyperlocomotion induced by amphetamine or by sleep deprivation and increase in high-frequency vocalizations by treatment with amphetamine) and depression (mild stress inducing depressive-like behavior, assessed by sucrose preference tests, forced swim and tail suspension). After the behavioral tests, we evaluated the effect of the treatment with myricitrin in the levels of monoamines, changes in levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and also in some markers of oxidative stress.

Our data suggest that myricitrin features: (a) type antimanic effect (reduction of hyperlocomotion induced by sleep deprivation and amphetamine, reduction of high-frequency ultrasonic vocalizations and latency of sleep after sleep deprivation), (b) antidepressant ( reversal of anhedonia and of increased immobility in the forced swimming test and the tail suspension induced by repeated mild stress), (c) reduce oxidative effect (d) revert the increases in IL-6 induced by repeated mild stress (e) revert adrenal weight gain induced by repeated mild stress. Therefore, myricitrin showed behavioral and physiological effects similar to antimanic and antidepressant drugs, indicating a good potential for development of new treatment for bipolar disorder.

## **INTRODUÇÃO:**

O transtorno de humor bipolar (THB) é um transtorno de grande impacto na vida do paciente, de sua família e da sociedade, causando prejuízos frequentemente irreparáveis em vários setores da vida do indivíduo, como nas finanças, saúde, reputação, além do sofrimento psicológico (Lopes e Murray, 1998; Yatham *et al.* 2005). A tônica de tal patologia são alterações de humor e incapacidade de responder corretamente aos estímulos externos, sejam estes ambientais ou interpessoais, em decorrência das oscilações de humor e comportamento (Lopes e Murray, 1998). As principais drogas, atualmente utilizadas, como estabilizadores de humor são: o lítio e o valproato de sódio, sendo o lítio considerado o padrão ouro no tratamento desta patologia (Nivoli *et al.* 2011). Durante a fase aguda do transtorno são utilizados ainda fármacos específicos em associação aos estabilizadores, a saber, antidepressivos e antipsicóticos para contenção de fase depressiva ou maníaca, respectivamente (Keck, 2003; Nivoli *et al.* 2011). Algumas das comorbidades associadas ao THB são: suicídio (Tondo *et al.* 2003; Colom *et al.* 2006), distúrbios alimentares (Shisslak *et al.* 1991; Mury *et al.* 1995), ansiedade (Regier *et al.* 1998), pânico (Bellodi *et al.* 1993; Andrews e Slade, 2002), agorafobia (Andrews e Slade, 2002; Bienvenu *et al.* 2006), fobia social (Lampe *et al.* 2003), transtorno de impulsividade (Merikangas *et al.* 2007) e abuso de substâncias (Freeman *et al.* 2002) sendo interessante notar que a maior parte destas comorbidades apresenta um forte componente serotoninérgico relacionado à sua gênese (Maes *et al.* 2011). Com base na gravidade e danos sociais e emocionais resultantes dessa doença se torna indispensável a criação de novos modelos animais para o estudo desta e também a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o seu tratamento (Rosa *et al.* 2008; Rosa *et al.* 2009).

### **1.1. Transtorno de humor bipolar (THB):**

O THB é caracterizado por oscilações cíclicas de humor, que vão desde alterações de humor (porém não muito exacerbadas), como as que ocorrem nos períodos subsindrômicos e eutímicos do transtorno, até mudanças patológicas acentuadas, que ocorrem na fase aguda da doença (Judd *et al.* 2002; Judd *et al.*

2008). A alternância entre estados depressivos e maníacos é a tônica deste transtorno; porém estados sub-clínicos e estados mistos também podem ocorrer, bem como estados de eutimia, que se caracterizam por um período de remissão de sintomas (Belmaker, 2004; Lima *et al.* 2005). De acordo com os trabalhos de Judd e colaboradores (2008) e Nivoli e colaboradores (2011), os pacientes bipolares passam aproximadamente 2/3 de suas vidas com humor caracterizável como depressivo e apenas 1/3 desta apresentando qualquer outro tipo de humor (maníaco/hipomaníaco ou eufórico), assim sendo, não é de se surpreender que a maior atenção seja dada a fase depressiva da doença que a fase de mania.

O THB acomete 1 a 5% da população (quando somados todos os subtipos da patologia), estando associado a um alto nível de prejuízo social e pessoal (Akiskal *et al.* 2000; Müller-Oerlinghausen *et al.* 2002). Em relação à prevalência de gênero, esta é igual em mulheres e homens (Graae *et al.* 2012); em termos de início de quadro, este é normalmente após os 20 anos, embora alguns casos se iniciem ainda na adolescência e outros mais tardiamente (Gitlin *et al.* 1995; Associação Psiquiátrica Americana, 2000). Existem indicativos de um forte componente genético no transtorno, uma vez que a taxa de concordância em gêmeos univitelinos é de 34,5% a 48%, taxa esta três vezes maior que a de gêmeos dizigóticos (McGuffin *et al.* 2003); além disto, a estimativa de ocorrência entre familiares de portadores apresenta um aumento de 10 a 20% quando comparado à população geral, demonstrando uma forte influência genética na patologia (Gershon *et al.* 1982; Merikangas *et al.* 2002).

Uma vez que a característica da patologia é a alternância entre os estados depressivo e maníaco/hipomaníaco, agora, estes serão discutidos de acordo com os critérios da APA (Associação Psiquiátrica Americana, 2000). Em relação à fase maníaca, sua caracterização se dá pela apresentação, por um período mínimo de uma semana, de alguns dos seguintes sinais e sintomas: comportamentos alterados principalmente quanto a necessidade de sono, psicomotricidade, cognição e nível de energia, aumento da auto-estima, taquilalia (caracterizada por uma taxa de articulação ou velocidade de fala elevada, suficientemente intensa para prejudicar a inteligibilidade da mensagem) e distrabilidade. Normalmente o paciente apresenta humor expansivo e eufórico e pensamentos de grandeza (podendo estes chegarem a ser delirantes), diminuição da necessidade de sono e aumento da energia, além de

iniciar nesta fase, muitas atividades dirigidas a um objetivo (o paciente inicia vários projetos ao mesmo tempo), ocorrendo também um aumento da sexualidade e uma expansividade social (DSM-V; Akiskal *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2005).

Por sua vez, durante a fase depressiva geralmente o paciente apresenta alguns (pelo menos 5 segundo o manual estatístico e diagnóstico de doenças mentais (DSM-V) dos seguintes sintomas por um período mínimo de 2 semanas: humor depressivo (sensação de angústia, tristeza, vazio, desesperança e desânimo), dificuldades de concentração e pensamentos de cunho negativo, incapacidade de sentir alegria ou prazer, redução da energia, agitação psicomotora ou, ao contrário, lentificação, podendo ocorrer ideação suicida e/ou sintomas psicóticos, além de alterações de apetite e do sono (DSM-V). Entretanto, no episódio depressivo não se observa somente uma alteração de humor, mas também alterações cognitivas e metabólicas. Uma das razões prováveis para tais alterações é o aumento da reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que tem por consequência alterações metabólicas da síndrome do X (resistência periférica à insulina, dislipidemia, hipertensão e obesidade), alteração na função tireoidiana e sexual, desequilíbrio no sistema imune e diminuição de volume do hipocampo com consequente prejuízo cognitivo (Tsigos e Chrousos, 2002). Estas manifestações corroboram a teoria da depressão como sendo um comportamento tipo doentio (*sickness behavior*), criando então um link entre a teoria de hiper-reatividade do eixo HPA e a teoria dos macrófagos na depressão (Smith, 1991; Miller *et al.* 2009). Além disto, aproximadamente metade dos pacientes também apresenta queixas somáticas como: cefaleia, dores no estômago e no peito e tonturas (von Knorring *et al.* 1983;1984; Yadid *et al.* 2000).

Por último, entre os episódios maníaco e depressivo, o paciente normalmente apresenta uma fase de eutimia. Entretanto, alguns autores consideram que esta fase deve ser mais que apenas a ausência de sintomas, pois nesta fase o paciente deveria também estar (re)integrado funcionalmente em suas atividades de rotina (Coffman *et al.* 1990; Joseph, 1999).

De acordo com os manuais diagnósticos como o DSM-V e o CID-10 (manual de classificação internacional de doenças 10 edição) o THB pode ser subdividido em: Transtorno bipolar do tipo I (apresenta fase de depressão, fase de eutimia e fase de mania); tipo II (no qual ao invés de fase de mania ocorre uma fase de hipomania),



ciclotímicos (pacientes bipolares que apresentam sintomatologia similar a o THB tipo II com duração mínima de 2 anos, porém de ciclagem rápida, mudança de estado em período inferior a uma semana e sintomatologia branda). A diferenciação básica entre os quadros de mania e hipomania se dá pela intensidade dos sintomas, sendo a hipomania menos acentuada e que somente pacientes que apresentam quadro maníaco poderão apresentar psicose relacionada a este período (Simpson *et al.* 1993; Belmaker, 2004). Estes episódios teriam um período de duração entre 4 e 13 meses, sendo que o episódio depressivo é sempre maior que o episódio maníaco/hipomaníaco e para ambos os tipos de pacientes bipolares, este último pode ser acompanhado de psicose (DSM-V).

Em relação às alterações biológicas que levam ao desenvolvimento do THB, as reais causas são desconhecidas. Existem muitos estudos mostrando as mais variadas alterações neuroquímicas em pacientes bipolares através de estudos *post-mortem*. Alguns destes achados também podem ser replicados em animais para que estes apresentem comportamentos similares à depressão e à mania, mas poucas teorias tentam explicar o que leva à oscilação comportamental. Acredita-se então que para o desenvolvimento de tal patologia, o que estaria ocorrendo na verdade seria uma convergência de fatores, como fatores ambientais e sociais (sendo o estresse o principal fator ambiental para desencadeamento de fase aguda do THB) e fatores biológicos, podendo ser estes genéticos (como, por exemplo, alterações no BDNF, COMT e MAO), neuroquímicos [por exemplo, alterações no equilíbrio da liberação de monoaminas ou alterações hormonais e atividade diminuída da bomba sódio-potássio ATPase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase)] e anatômicos (por exemplo, alargamento de ventrículos e sulcos) (Thorpe *et al.* 1987; Shih, 1991; El-Mallakh e Wyatt, 1995; Heninger *et al.* 1996; Berman *et al.* 1997; Craddock *et al.* 2001; Müller-Oerlinghausen *et al.* 2002; Neves-Pereira *et al.* 2002; Coyle e Duman, 2003; Farvolden *et al.* 2003; Nakata *et al.* 2003; Shifman *et al.* 2004; Hanh *et al.* 2005; Yatham *et al.* 2005; Green *et al.* 2006; Watson e Mackin, 2006; Herman *et al.* 2007; Yildiz *et al.* 2008). Uma vez que a fase maníaca e a depressiva são em muitos aspectos opostas e se apresentam de forma oscilatória no THB, torna-se difícil a criação de um modelo animal para o estudo do THB propriamente dito. Assim, a maioria dos modelos para o estudo do THB é relacionada a uma ou outra fase. Existe hoje uma vasta gama de modelos animais válidos, bem como fármacos para

o tratamento da fase depressiva (Kayser *et al.* 2011), embora não totalmente eficazes. Mas, em relação à fase maníaca da doença, infelizmente, ainda existem muitas dificuldades para criação de modelos animais que mimetizem tal fase e, conseqüentemente, também para a busca de novos fármacos para seu tratamento (Flaisher-Grinberg *et al.* 2010; Cipriani *et al.* 2011).

## 1.2. Teorias neurobiológicas da mania:

Em relação à fase maníaca, algumas teorias vêm sendo propostas como alterações glutamatérgicas, dopaminérgicas e, principalmente, alterações da proteína quinase C (PKC), além de estudos genéticos correlacionando alterações nos gene CLOCK, alterações nos padrões de sono e desenvolvimento de comportamento tipo maníaco (Dixon e Hokin, 1998; Bymaster e Felder, 2002; Sabione *et al.* 2008; Yildiz *et al.* 2008; Szabo *et al.* 2009). Em relação aos marcadores biológicos têm sido citados o aumento do estresse oxidativo e o aumento dos níveis e da atividade da PKC (Frey *et al.* 2006; Yildiz *et al.* 2008). Em relação aos neurotransmissores associados ao quadro de mania, trabalhos relacionam o aumento da dopamina (DA) ao desenvolvimento dos sintomas maníacos. Por exemplo, fármacos que antagonizam a atividade dopaminérgica, como os antipsicóticos, são efetivos no tratamento do quadro de mania (Bhana e Perry, 2001; Bymaster e Felder, 2002) e substâncias que têm por característica aumentar a liberação de dopamina (como por exemplo, a anfetamina) ou são agonistas dopaminérgicos (como por exemplo, a apomorfina) podem precipitar ou mimetizar (no caso de testes animais) comportamentos maníacos (Sultzer e Cummings, 1989; Peet e Peters, 1995). De acordo com Young e colaboradores (2011), animais *knockout* para o transportador de dopamina (DAT) apresentavam comportamento de risco aumentado quando comparados com animais selvagens, sendo que o mesmo é observado após a administração de anfetamina (Zeeb *et al.* 2009). Ainda nesta linha, estudos têm mostrado uma grande importância do córtex pré-frontal em tais atividades de risco, uma vez que a lesão desta área leva, tanto humanos quanto animais, a um comportamento de risco aumentado, o que é observado tanto em pacientes maníacos quanto em voluntários sob uma hiperestimulação do sistema dopaminérgico (Clark *et al.* 2001). Por último, em

relação ao principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), o glutamato (Glu), parece haver uma diminuição glutamatérgica, uma vez que estudos têm mostrado que o lítio aumenta a quantidade de glutamato livre (provavelmente por diminuir sua recaptção) em estudos “*in vitro*”; porém estudos “*in vivo*”, nos quais os animais foram tratados por duas semanas com lítio, mostraram um aumento da captação de glutamato e diminuição da amplitude de variação de sua captação (Dixon e Hokin, 1998). Interessante que, de acordo com Szabo e colaboradores (2009) a hiperatividade da PKC poderia ser a responsável por esta hipofuncionalidade glutamatérgica, sendo decorrente de uma fosforilação dos receptores glutamatérgicos pela PKC.

Outra linha de pesquisa envolvendo a fisiopatologia do THB é referente a alterações nos ritmos circadianos e sua correlação com alterações de humor, principalmente na precipitação de sintomas maníacos nos pacientes bipolares. Estudos relatam que alterações no ciclo de sono, principalmente quadros de insônia, parecem ser preditivos de possível virada maníaca em pacientes depressivos ou em eutímia (Piletz *et al.* 1994; Feldman-Naim *et al.* 1997). Mais ainda, de acordo com o trabalho de Brill e colaboradores (2011) as alterações de sono são muito comuns em pacientes eutímicos e podem ser tomadas como sintoma remanescente do THB e que ao se intensificar pode ser um fator predisponente da recaída. Outros estudos mostram que alterações nos genes relacionados ao controle do ciclo sono-vigília, como o gene CLOCK, levam a alterações comportamentais em animais, similares àquelas observadas em pacientes maníacos, como hiperatividade em ambientes novos, diminuição da necessidade de sono e baixa aversão à situação de risco, bem como o comportamento tipo ansioso (Wehr *et al.* 1983; Jones, 2001). De acordo com o trabalho de Mansell e Pedley (2008), pelo menos 75% dos estudos com pacientes bipolares citam algum tipo de alteração de sono entre os sintomas observados nos pacientes maníacos; além disso, de acordo com o estudo de Colombo e colaboradores (1999), a privação de sono, por três dias, em pacientes bipolares deprimidos pode levar ao desenvolvimento de sintomas de mania em 10%. Esses dados então demonstram a importância das alterações de sono para o entendimento da neurobiologia da mania.

Talvez a teoria atualmente mais estudada, relacionada ao desenvolvimento da mania é a que relaciona tal quadro a um aumento da atividade da PKC. Os

estudos têm mostrado alteração na atividade da PKC nos pacientes bipolares, sendo observado aumento da translocação desta do citosol para a membrana em plaquetas, havendo diminuição desta translocação após tratamento com estabilizadores de humor (Hanh *et al.* 2005). Além disso, em estudos *post-mortem* em pacientes bipolares, foi observado um aumento da PKC ativada na área do córtex frontal (Wang e Friedman 1996). É interessante notar que as substâncias psicoestimulantes (por exemplo, anfetamina e cocaína), que podem precipitar comportamentos maníacos em pessoas suscetíveis, têm como um dos alvos de ação a PKC (Kessler, 2004; Chen *et al.* 2009a). A PKC tem uma distribuição heterogênea no cérebro, e desempenha um papel importante na regulação da excitabilidade neuronal, liberação de neurotransmissores e alterações de longo prazo na expressão gênica e plasticidade (MacDonald *et al.* 2001). Estudos reportam que o aumento da sua expressão em pacientes maníacos estaria relacionada à hiperatividade motora, comportamento de risco e comportamento hedônico excessivo (Szabo *et al.* 2009). A ativação da PKC leva à ativação subsequente de sistemas monoaminérgicos, com maior atividade no sistema dopaminérgico (White & Kalivas, 1998; Chen 2009b). Em relação ao tratamento do THB, estudos mostram que fármacos estabilizadores de humor, como o lítio e o valproato, atuam nos subtipos  $\alpha$  e  $\epsilon$  da PKC, inativando-os. Embora estas drogas possuam diversos mecanismos de ação, o padrão de ação destes estabilizadores parece ser, ao menos em parte, devido à diminuição da ativação da PKC (Manji e Lenox, 1999; Manji e Chen, 2002; Watson e Lenox, 1996). Por último, um fármaco atualmente relacionado ao tratamento do THB, o tamoxifeno, cuja atividade no quadro de mania do THB foi documentada tanto em testes animais quanto em humanos, apresenta como mecanismo de ação a diminuição da atividade da PKC (Sabione *et al.* 2008; Yildiz *et al.* 2008; Pereira *et al.* 2011). Portanto, considerando a proposta da participação da PKC no desenvolvimento do comportamento maníaco, as substâncias que apresentam ação inibitória sobre a PKC podem ser protótipos para o estudo e desenvolvimento de novas drogas antimaníacas.

Cabe ressaltar que o aumento da atividade da PKC, bem como o aumento da metabolização de monoaminas, poderiam então levar a um aumento de demanda de energia e a uma hiperfuncionalidade da mitocôndria, além de um gasto maior de oxigênio pelo cérebro, tendo por consequência, o aumento do estresse oxidativo. O

estresse oxidativo pode ser considerado um desbalanço entre a concentração de antioxidantes endógenos e a produção de espécies reativas, tanto de oxigênio quanto nitrogênio, e sua eliminação pelos sistemas de defesa do corpo (Cross *et al.* 2002). O cérebro é em particular vulnerável à produção de espécies reativas, pois metaboliza 20% do oxigênio total do corpo e possui uma capacidade antioxidante limitada (Floyd, 1999). Algumas dessas enzimas de defesa contra a produção de radicais livres são a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GSH (glutathiona) e GST (glutathiona S-transferase). Alterações em seus níveis, bem como aumento da peroxidação lipídica (LPO), são tomados como indicativo de desbalanço da homeostasia da produção de espécies reativas. Tem sido levantada a hipótese de que o THB está associado com disfunções na mitocôndria (Kato e Kato, 2000) que pode levar a uma queda nas trocas de energia e degeneração celular (Calabrese *et al.* 2001). O aumento do estresse oxidativo já foi reportado em estudos tanto em humanos na fase maníaca quanto em modelos animais de mania. Por exemplo, Frey e colaboradores (2006) observaram que a anfetamina (que aumenta a atividade dopaminérgica) levaria a um aumento dos níveis de estresse oxidativo e o tratamento com lítio reverteria este aumento. Assim sendo, a análise dos níveis de estresse oxidativo pode ser vista como um possível marcador biológico, sendo interessante ainda citar que, uma vez que as concentrações das enzimas de defesa são baixas no cérebro (em média 4x menor que no fígado), se torna mais interessante a mensuração de marcadores não enzimáticos como a LPO e a GSH (Machado-Vieira *et al.* 2007).

### 1.2.1. Modelos animais no estudo da mania:

Como mencionado anteriormente, as principais alterações observadas durante a fase maníaca do THB são: alterações dopaminérgicas, alterações de sono e da PKC. Como também já citado, os principais sintomas da mania são aumento de energia que resultaria em hiperatividade, comportamento de risco, hipersexualidade, agressividade e fala rápida com fuga de ideias. Para o estudo da mania hoje em dia os modelos estão relacionados com a indução de hiperatividade através da administração de psicoestimulantes (tais como anfetamina) ou pela privação de

sono, sensibilização por morfina, comportamento de risco, comportamento agressivo e alguns modelos genéticos (Gessa *et al.* 1995; Niculescu *et al.* 2000; Flaisher-Grinberg *et al.* 2010; Grappi *et al.* 2011).

Até o presente momento, o modelo mais bem estabelecido para o estudo da mania é o de hiperatividade desencadeada pela administração de psicoestimulante. A estimulação por anfetamina seguida por teste de campo aberto apresenta uma boa validade preditiva e de face, mas não reproduz várias das alterações psicopatológicas que ocorrem na fase maníaca, mas apenas a hiperatividade dos pacientes durante o episódio maníaco (Decker *et al.* 2000; Einat, 2000; Nestler *et al.* 2002a; Perry *et al.* 2010). Por outro lado, a existência de alterações dopaminérgicas já foi documentada em pacientes maníacos e drogas psicoestimulantes induzem sintomas maníacos em pacientes com THB e sintomas tipo maníacos em voluntários saudáveis, sendo estes reversíveis pelo tratamento com lítio e ácido valpróico (Zarate e Manji, 2009). Além disso, de acordo com os trabalhos de Ahrens e colaboradores (2009) e de Brudzynski e colaboradores (2011), a estimulação do sistema dopaminérgico seria responsável pelo aumento do número de vocalizações de ratos e camundongos, podendo talvez este aumento de vocalização ser relacionado à taquilalia dos pacientes maníacos. Assim sendo, por mais que a estimulação do sistema dopaminérgico não esteja relacionada à todos os sintomas da mania, esta estaria envolvida em pelo menos dois dos sintomas observados.

Por sua vez, o modelo de privação de sono parece reproduzir melhor a psicopatologia do episódio maníaco, mimetizando a hiperatividade, a hipersexualidade e a agressividade dos pacientes maníacos (validade de face). Além disto, reproduz também várias alterações neuroquímicas como a hiperatividade dopaminérgica e hipoatividade do sistema opióide, como ocorre em pacientes durante a fase maníaca. (validade de constructo). Ressalta-se que os bloqueadores dopaminérgicos são os agentes de primeira escolha em o tratamento de mania aguda (Gessa *et al.* 1995; Yatham *et al.* 2002; Yatham *et al.* 2005). Mais ainda as alterações causadas por privação de sono não são induzida por drogas, evitando a questão de interação farmacocinética entre o psicoestimulante e a droga teste e a limitação das alterações neurobiológicas ficarem restritas ao mecanismo de ação da droga psicoestimulante. Além disso, estes animais apresentam maior latência de sono após a privação de sono, o que é diminuída por algumas drogas

com atividade antimaniáca (como o lítio, por exemplo), tornando este teste mais interessante, uma vez que alterações de sono estão relacionadas com o desenvolvimento de comportamento maníaco (Gessa *et.al.* 1995) e a privação de sono parece desencadear episódios maníacos em pacientes com THB (Colombo *et al.* 1999).

O modelo de sensibilização à morfina é baseado na premissa de que o estresse repetido provoca um comportamento anedônico em camundongos e ratos (este comportamento é normalmente induzido em animais para o estudo da depressão), porém quando o animal é sensibilizado com morfina, este se torna resistente ao desenvolvimento da anedonia e esta resistência poderia então ser tomada como um possível modelo para estudar a mania. Além disso, o tratamento com lítio reverte a resistência à anedonia induzida pelo estresse causado pela sensibilização por morfina (validade preditiva) (Grappi *et al.* 2011). Finalmente, em relação aos modelos genéticos, eles mimetizam algumas alterações psicopatológicas e neuroquímicas da doença, que respondem a drogas antimaniacas (validade de face, preditiva e construto), mas têm o inconveniente de serem de difícil implementação (animais *knockin* ou *knockout* são caros e dependem de condições especiais de manutenção) e, além disso, não reproduzem algumas características do paciente, talvez por ainda não estarem claras todas as alterações genéticas, anatômicas e neuroquímicas e moleculares do episódio maníaco (Malkesman *et al.*, 2009). Como é possível ver, ainda não temos um modelo com boa validade para o estudo da mania, uma vez que os modelos e testes existentes só reproduzem certos aspectos do comportamento, não mimetizando as alterações emocionais, que são características marcantes das mudanças de humor de pacientes bipolares.

### 1.3. Teorias neurobiológicas da depressão:

Quando se pensa em depressão, normalmente a primeira visão é da depressão maior, porém existem muitos tipos de depressão. De acordo com o DSM-V, os subtipos de depressão são: depressão maior, transtorno de humor induzido por substância, transtorno de humor devido a condição médica geral, depressão

sazonal, perturbação ou desregulação de humor, transtorno disfórico pré-menstrual e depressão associada a outras condições. De acordo com Nestler e colaboradores (2002b), as formas mais severas de depressão afetam de 2 a 5% da população americana e mais de 20% apresentam a forma mais branda. Portanto, pensando-se nas múltiplas formas da depressão, é possível se deduzir que sua neurobiologia é complexa e multifatorial. Devido a tal complexibilidade, surgiram várias teorias que tentam explicar as causas da depressão, sendo as mais estudadas a teoria monoaminérgica, a teoria de hiper-responsividade do eixo HPA ao estresse e a teoria neuroinflamatória na depressão.

Embora se considere hoje que não somente alterações em neurotransmissores (como dopamina, serotonina e noradrenalina) estão envolvidas na fisiopatologia da depressão, a teoria monoaminérgica é a mais antiga das teorias ainda estudadas e também a que levou ao desenvolvimento da maioria dos medicamentos antidepressivos em uso. A formulação desta teoria é baseada principalmente nas observações de que os primeiros fármacos antidepressivos atuam nas monoaminas (iproniazida, um inibidor da MAO, e a imipramina, um inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina) e que a reserpina, um anti-hipertensivo que depleta as monoaminas, leva a quadro de depressão (Gronli *et al.* 2007). É bem documentada a redução de monoaminas, mais especificamente noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), porém indícios de diminuição de dopamina também são frequentemente relatados em pacientes depressivos (Rampello *et al.* 1991; Bonhomme e Esposito, 1998; Anand e Charney, 2000; Hirschfeld, 2000). Ressalte-se que a ocorrência de alteração nos níveis de neurotransmissores é um achado frequente na depressão, porém caso fosse esta a única alteração neurobiológica, a responsividade dos pacientes aos antidepressivos (que em sua grande maioria tem por função o aumento da disponibilidade de neurotransmissores) seria total, o que não ocorre (Ruhé *et al.* 2007). Na realidade apenas 65% dos pacientes são responsivos ao tratamento com antidepressivos, e esta resposta ocorre apenas após quatro semanas de tratamento em média (Berton e Nestler, 2006). Assim sendo acredita-se que eficácia dos antidepressivos não esteja relacionada ao aumento imediato dos níveis de monoaminas nas sinapses, mais sim à estimulação de cascatas intracelulares decorrentes deste aumento, como, por exemplo, a elevação dos níveis de neurotrofinas e alterações da plasticidade



cerebral (Pittenger e Duman, 2008). Estudos mostram que em pacientes depressivos ocorre uma diminuição da neurogênese hipocampal e que o tratamento com antidepressivos, além da reversão dos sintomas da depressão, leva a um restabelecimento das neurotrofinas (Cunha e Frey, 2006). Esta diminuição da neurogênese levaria a dois dos possíveis sintomas da depressão, o déficit cognitivo e a diminuição da neurogênese. A partir deste ponto, grande foco tem sido dado ao BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) na depressão, uma vez que tem sido observado um decréscimo dos níveis de BDNF como um fator comum entre pacientes deprimidos. O BDNF se liga ao receptor TrkB (da família *trk*, que apresenta atividade proteína quinase) e a ativação dos receptores TrkB pelo BDNF contribui para a sobrevivência celular, crescimento neural, transmissão sináptica, plasticidade e migração celular (Post 2007). Em relação à memória, estudos têm correlacionado a diminuição do BDNF com o prejuízo de memória presente em pacientes depressivos (Karege *et al.* 2005; Schmidt e Duman, 2010).

Outro neurotransmissor que tem sido associado com o desenvolvimento da depressão é o GABA (ácido gama aminobutírico), sendo importante ressaltar que este neurotransmissor está relacionado com a modulação da neurotransmissão de monoaminas como dopamina, serotonina e noradrenalina. Associa-se uma diminuição da transmissão GABAérgica com a depressão, pois o estresse diminui a taxa de atividade de GABA e agonistas e antagonistas GABA-A modulam o comportamento dos animais em modelos de depressão. Em relação a estudos clínicos, alguns autores propõem que fármacos que aumentam a transmissão GABAérgica têm atividade antidepressiva e antimaniaca (Brambilla *et al.* 2003). Além disto, existem estudos que demonstram diminuição de GABA no plasma em pacientes bipolares, inclusive na eutimia (Petty, 1995; Petty *et al.* 1996; Brambilla *et al.* 2003; Tunnicliff e Malatynska, 2003).

Por último, em relação ao principal neurotransmissor excitatório do SNC, o glutamato, os resultados encontrados na maioria dos trabalhos indicam um aumento na disponibilidade deste neurotransmissor na depressão (Mason *et al.* 2000; Sanacora *et al.* 2004; Bhagwagar *et al.* 2007). Estes dados foram obtidos tanto em estudos em animais quanto em humanos, onde a administração de antagonistas do receptor NMDA (N-Metil-D-Aspartato), como a quetamina, apresenta efeito antidepressivo. Uma correlação importante com a funcionalidade glutamatérgica é a

produção de óxido nítrico (NO) uma vez que esta é dependente da ativação dos receptores NMDA (Gally *et al.* 1990; Salum *et al.* 2008). O NO influi em funções como neurotransmissão, plasticidade sináptica, aprendizado, percepção de dor, agressão e comportamento anedônico (Mantovani *et al.* 2003; Dühr e Kulkarni, 2007). Estudos têm demonstrando que a diminuição da atividade nitrérgica no hipocampo apresenta efeitos antidepressivos e com isso foi teorizada a implicação do NO nas alterações associadas ao estresse e à depressão (Joca e Guimarães, 2006; Harkin *et al.* 2004). No estudo de Wegener e colaboradores (2000) foi demonstrado que inibidores da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) aumentam os níveis de serotonina e dopamina no hipocampo ventral de ratos e que L-arginina (precursor do NO) apresenta efeito oposto, mostrando que o NO endógeno pode controlar negativamente os níveis de serotonina e dopamina no hipocampo. Ainda é importante citar que estudos têm demonstrado a importância do sistema nitrérgico na modulação da atividade serotoninérgica, sendo que o NO modularia a liberação e inibiria a enzima de síntese da serotonina (Kuhn e Arthur, 1996) e inativaria a própria serotonina (Fossier *et al.* 1999). A hiperatividade do sistema glutamatérgico também poderia estar relacionado com a morte neuronal documentada em pacientes depressivos, uma vez que o glutamato em excesso apresenta atividade citotóxica. Além disso, o aumento da ativação dos receptores NMDA e consequente aumento nos níveis de NO poderia desencadear um aumento nos níveis de estresse oxidativo o que também já foi documentado tanto em animais quanto em humanos em quadro de depressão (Michaelis, 1998; Andreatza *et al.* 2008).

Outra teoria propõe uma alteração do eixo HPA no desenvolvimento da depressão. Henn e Vollmayr (2004) postulam que o desenvolvimento da depressão teria por base 25% de influência genética e 75% seria o resultado de fatores ambientais. De acordo com a definição de Hans Selye, o organismo responderia a fatores estressores tanto externos quanto internos com uma série de respostas fisiológicas orquestradas no intuito de manter a homeostasia e esta adaptação seria chamada de “síndrome geral da adaptação” (Szabo, 1985), sendo que o principal centro de resposta e adaptação seria o eixo HPA. A inadaptação a tais fatores então seria um fator que poderia desencadear o desenvolvimento da depressão. Segundo esta teoria, fatores genéticos precipitariam uma maior responsividade a fatores estressores e a exposição a esses fatores levaria a uma resposta aumentada ao

estresse pela inabilidade do sistema em se auto inibir. Esta responsividade aumentada já foi documentada em pacientes depressivos, por exemplo, e tal alteração leva a uma instabilidade da liberação de hormônios alterando a homeostase cerebral (Kandel, 2000; Stephen *et al.* 2005). Diante de um estímulo estressor as células dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na microcirculação hipofisária, sendo que o CRH na hipófise levará a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, ao agir sobre a adrenal, levará a produção de glicocorticoides. Os glicocorticoides por sua vez irão modular a atividade do eixo HPA, promovendo um estímulo inibitório à produção de CRH e ACTH através de sua ação no hipocampo e hipotálamo (Aguilera *et al.* 2007). Caso haja falha em tal retroalimentação negativa, o sistema não será então capaz de cessar sua atividade e esse estado de hiperatividade levaria a hipo-responsividade dos receptores para CRH, aumento dos níveis de cortisol, alterações metabólicas, alteração na função tireoidiana e sexual, desequilíbrio no sistema imune e diminuição de volume do hipocampo com consequente prejuízo cognitivo (Tsigos e Chrousos, 2002). Além disso, é importante citar que os neurônios que apresentam receptores para CRH, presentes no sistema límbico, fazem extensas conexões com neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos (Nemeroff, 2002). Em relação às alterações nas concentrações de BDNF após a exposição a fatores estressores, dados oriundos principalmente de trabalhos com animais, mostram que a exposição ao estresse leva à diminuição de BDNF e o tratamento com antidepressivos reverte tal quadro. (Shirayama *et al.* 2002; Saarelainen *et al.* 2003; Sairanen *et al.* 2005; Berton e Nestler 2006; Li *et al.* 2008).

Relacionado à precipitação do quadro de depressão em decorrência de estresse, outra teoria propõe que o estresse precipitaria o aumento de citocinas e em decorrência deste aumento ocorreria o comportamento depressivo, que seria um comportamento tipo doentio (Thomas *et al.* 2005; Miller *et al.* 2009). Estudos têm associado aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias ao desenvolvimento da depressão ou comportamento doentio (*"sickness behavior"*), sendo as principais citocinas a IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa). No trabalho de revisão feito por Goshem e Yirmiya (2009) a IL-1 foi citada como reguladora central da resposta ao estresse, estando, portanto

relacionada à liberação de glicocorticoides. Assim sendo, a depressão, segundo estes autores, seria um comportamento doentio, ou seja, um fenômeno psiconeuroimunológico. Estudos em humanos e animais têm demonstrado uma correlação entre os níveis de IL-6 e a depressão (Kubera *et al.* 2004; Monje *et al.* 2011). De acordo com Kubera e colaboradores (2004) quanto maiores os níveis de IL-6, maior o grau de depressão (gravidade dos sintomas). Outra citocina pró-inflamatória relacionada à depressão é o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), sendo que o aumento de TNF- $\alpha$  tem sido associado com o desenvolvimento de quadros de depressão e que, para ambas as citocinas, os pacientes costumam normalizar os níveis após tratamento com antidepressivo (O'Brien *et al.*, 2007).

### 1.3.1. Modelos animais no estudo da depressão:

Os modelos animais de depressão são amplamente utilizados na tentativa de melhor entender sua fisiopatologia bem como para tentar produzir novos fármacos mais efetivos para o seu tratamento. Infelizmente esses modelos apresentam certas restrições uma vez que são incapazes de mimetizar características mais psicológicas, como sentimento de culpa, ideação suicida e humor depressivo. Entretanto os modelos hoje existentes são efetivos em mimetizar a anedonia presente em pacientes depressivos, o que é uma característica marcante da depressão e um importante critério diagnóstico. Embora seja impossível recriar todos os sintomas de uma determinada patologia em animais, principalmente em se tratando de transtornos psiquiátricos com um fundo multifatorial, são os modelos animais que nos possibilitam compreender melhor a neurobiologia da patologia e à medida que estes são responsivos ao tratamento com os fármacos hoje existentes, podemos então criar um paralelo entre o comportamento do animal (embora carente de todos os sintomas da doença) e a patologia em si.

Ainda é importante ressaltar aqui que para um teste ou modelo ser válido, ele deve ter ao menos uma das seguintes validades: validade preditiva (o comportamento induzido no animal é revertido ou prevenido com o tratamento utilizando-se os fármacos, eficazes em humanos, para aquela condição); validade de face (quanto um modelo é capaz de reproduzir sintomas e/ou comportamentos da

doença em estudo); validade de constructo (quanto o modelo reproduz os mecanismos neurobiológicos da doença) (Freis e Magalhães, 2010). Dentre estes parâmetros a serem validados, pode-se dizer que os testes mais antigos para o comportamento tipo depressivo apresentam normalmente validade preditiva, como é o caso do teste de nado forçado e o teste de suspensão pela cauda (Nestler *et al.* 2002a,b). Nestes dois testes os animais são submetidos a uma situação inescapável e é avaliado o tempo de imobilidade, que é tomado como comportamento tipo depressivo e fármacos antidepressivos são efetivos em diminuir a imobilidade (Cryan *et al.* 2002; Skalisz *et al.* 2004; Raupp *et al.* 2008).

Entretanto um modelo também muito utilizado para o estudo da depressão é o de estresse brando repetido e imprevisível (*Chronic mild stress – CMS*) (Willner *et al.* 1987), que por mimetizar alterações encontradas em pacientes com depressão, como aumento dos níveis de cortisol e citocinas, diminuição de BDNF, comportamento anedônico e aumento nos níveis de estresse oxidativo seria então considerado um modelo que apresenta não só validade preditiva mas também de face e de constructo (McArthur e Borsini, 2006; Casarotto e Andreatini, 2007). Este modelo se baseia em expor o animal a uma variedade de situações estressoras diariamente e desta forma induzir um comportamento tipo anedônico que é mensurado pelo teste de consumo de sacarose (McArthur e Borsini, 2006). A exposição de roedores a fatores estressores de uma maneira continuada mimetiza muitos dos aspectos observados em pacientes depressivos, como aumento dos níveis de interleucinas (Monje *et al.* 2011); aumento dos níveis de corticosterona plasmática (Kubera *et al.* 2001; Joels *et al.* 2004) com consequente hipertrofia da adrenal (Reul *et al.* 1993); alterações de sono REM (Moreau *et al.* 1995); diminuição de comportamento sexual (D'Aquila *et al.* 1994), aumento do estresse oxidativo (Eren *et al.* 2007) e comportamento exploratório e diminuição da neurogênese hipocampal (Joels *et al.* 2004). Fato importante de ressaltar é que apenas o tratamento repetido, mas não agudo, com antidepressivos reverte as alterações induzidas pelo estresse brando repetido e imprevisível.

#### 1.4 Tratamento farmacológico do THB:

O tratamento do THB é dividido em fases de acordo com o estado do paciente, sendo as fases: tratamento de mania aguda, tratamento de depressão aguda ou manutenção. O tratamento normalmente é feito com a utilização de um estabilizador de humor, sendo o lítio e o valproato os fármacos mais utilizados, somado a antidepressivo ou antipsicótico e sedativos, para contenção das fases de depressão e de mania aguda, respectivamente (Goodwin, 2003; Gijsman *et al.* 2004; Lafer e Soares, 2005; Moreno *et al.*, 2005). Após a estabilização do quadro agudo, o tratamento é mantido apenas com estabilizador de humor (Geddes *et al.*, 2004; Souza, 2005).

Em relação ao tratamento da mania ou hipomania em fase aguda, a utilização de antipsicóticos, anticonvulsivantes e até mesmo de sedativos é efetiva em conter os sintomas. Os principais antipsicóticos utilizados são os atípicos, como por exemplo, a olanzapina (Moreno *et al.* 2005; Cipriani *et al.* 2011). Em relação aos anticonvulsivantes, o ácido valpróico (valproato) e a carbamazepina são eficazes (Cipriani *et al.* 2011), existindo dados sugerindo um potencial efeito da fenitoína (Tonelli *et al.* 2013).

Os principais antidepressivos utilizados na clínica são agrupados segundo seu principal efeito (no tratamento agudo) sobre as monoaminas, em: inibidores da recaptação (seletivos ou não seletivos), inibidores da metabolização e atípicos. Os principais tipos então seriam: inibidores seletivos da recaptação (para a serotonina, por exemplo a fluoxetina; para a noradrenalina, por exemplo a reboxetina), inibidores não seletivos (para a serotonina e a noradrenalina, como por exemplo a duloxetina e a imipramina; para a dopamina e a noradrenalina, como por exemplo a bupropiona); inibidores da MAO - monoamino oxidase (ex.: moclobemida e selegilina); e atípicos como os antagonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos (mirtazapina) antagonistas 5HT<sub>2</sub> (nefazodona) antiglutamatérgicos (quetamina) e agentes melatoninérgicos (agomelatina) (Souza, 1999; Stahl, 2002; Lafer e Soares, 2005).

O terceiro grupo de drogas são os estabilizadores de humor, que são utilizados durante todas as fases do THB, sendo os mais amplamente utilizados o lítio e o valproato. O mecanismo de ação do lítio é relacionado a alterações nas vias do inositol trifosfato (teoria de depleção de inositol pela ação em fosfatases) e da

adenilato ciclase. Além disto, uma vez que o lítio é similar a outros íons (por exemplo: sódio), este também pode influenciar no equilíbrio da liberação de monoaminas. Além disto, a administração de lítio resulta em um aumento na concentração de serotonina livre e diminuição da noradrenalina (Guimarães, 2000; Goodwin *et al.* 2003; Machado-Vieira *et al.* 2003). Mais ainda, como já citado, o lítio atua como inibidor da PKC, o que auxilia no tratamento da fase maníaca. O lítio apresenta grande eficácia no tratamento do THB, sendo por isso um dos fármacos mais utilizados até hoje como agente antimaniaco, apresentando também efeito antidepressivo. Entretanto apresenta como efeito colateral, após tratamento prolongado, toxicidade que afeta a tireóide e rins dos pacientes, além de significativo aumento de peso, necessitando ainda de um constante controle sérico dos seus níveis (Stahl, 2002). Por sua vez, o mecanismo de ação do valproato seria mais relacionado à inibição da PKC. Outros estudos também apontam que este apresenta atividade sobre o sistema GABAérgico, que conseqüentemente irá influenciar na balanço do sistema monoaminérgico, auxiliando que este volte ao equilíbrio da liberação (Maes *et al.* 1997).

Embora o carbonato de lítio e o ácido valpróico (valproato de sódio e divalproato), denominados estabilizadores do humor, apresentem uma boa efetividade clínica na mania, existem pacientes que não respondem a estas drogas ou que são intolerantes aos efeitos adversos (Keck, 2003; Moreno *et al.* 2005; Souza, 2005). Por sua vez, o uso de antidepressivos na fase depressiva pode acarretar virada maníaca ou agravar a ciclicidade dos episódios (Lafer e Soares, 2005; Belmaker, 2007). Já os antipsicóticos atípicos, úteis na fase maníaca, têm sido associados a distúrbios metabólicos (Keck, 2003; Moreno *et al.* 2005). Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos para o THB.

### 1.5 Miricitrina:

A miricitrina (Fig.1) é um flavonóide, do subgrupo flavonol, extraído de várias plantas do gênero *Pouteria*, como por exemplo, da *Manilkara zapota* e da *Eugenia uniflora* (Ma *et al.*, 2003, 2004) e com estrutura similar à da miricetina, porém a miricitrina é glicosilada. De acordo com o trabalho de Smith e Griffiths (1970) a incubação do glicosídeo miricitrina (miricetina 3-ramnosídeo) com micro-organismos

intestinais da flora intestinal de ratos deu origem a miricetina livre, ácido 3,4,5-tri-hidroxifenilacético e ácido 3,5-di-hidroxifenilacético, indicando que os microrganismos intestinais são capazes de efetuar a clivagem da ligação glicosídica, bem como o sistema de anel heterocíclico da miricitrina e esta passa então a ter ação similar à das já mostradas para o flavonóide mircetina. Ainda em relação à cinética da substância, o estudo “*in vitro*” feito por Yokomizo e Moriwaki (2005a), demonstrou que a miricitrina apresenta boa absorção pelo trato gastrointestinal após 30 minutos (porém o pico se deu após 2 horas com uma porcentagem de 68% de absorção) de administração e que sua absorção se dá de forma passiva através da via para-celular (transporte é feito entre as junções extracelulares).

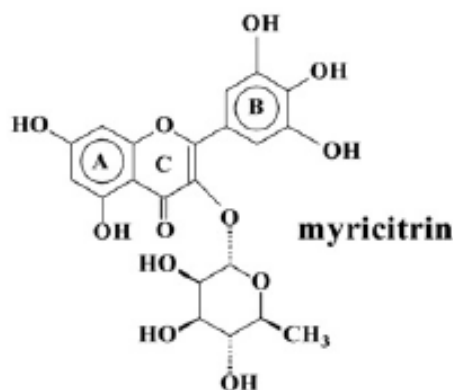


Fig.1: Estrutura química da miricitrina

As principais atividades deste flavonóide são relacionadas a efeitos antioxidantes, antinociceptivo, antialérgico, antiinflamatórios e antioncogênicos (Middleton *et al.* 2000; Birt *et al.* 2001; Edenharder e Grünhage, 2003; Meotti *et al.* 2006, 2008; Shimosaki *et al.* 2011). Por outro lado, a ação deste flavonóide no SNC somente é remetida a uma possível atividade ansiolítica e antipsicótica (Fernandez *et al.* 2009; Pereira, 2011). Dentro dos mecanismos de ação estabelecidos para este flavonóide, foi demonstrada sua capacidade de atuação sobre o NO, nNOS, PKC, PI3-K e NFkB (Agullo *et al.* 1997; Gamet-Payraastre *et al.* 1999; Meotti *et al.* 2006).

No que se refere a sua ação antioxidante, os estudos já realizados avaliaram somente a ação antioxidante da miricitrina “*in vitro*”, através do ensaio de DPPH (ensaio de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil), no qual esta se mostrou um potente efeito antioxidante (Zhong *et al.* 1997; Luo *et al.* 2002). Outro estudo feito por Yokomizo e



Moriwaki (2005b) demonstrou efeito protetor contra a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) por apresentar atividade quelante de metal e seqüestradora (scavenger) de radicais livres. Em relação a sua atividade nitrérgica, esta ocorre pela inibição da síntese do NO, atuando diretamente na cascata de síntese, modulando a atividade da nNOs (Palmer *et al.* 1987; Gally *et al.* 1990), sendo que para a ativação da nNOs é necessária a ativação do receptor NMDA. É importante citar também que existe uma correlação entre a PKC e a produção do NO, uma vez que receptores NMDA podem ser modulados através de fosforilação/defosforilação por enzimas como a PKC (Gerber *et al.* 1989; Chen e Huang, 1992) e a PKA (Raman *et al.* 1996). Assim sendo, além da inativação da via da nNOS, a miricitrina também atuaria indiretamente por diminuir a fosforilação de receptores NMDA e com isso diminuir a produção de NO.

A PKC, consiste em um grupo de enzimas que apresenta em comum a ativação dependente de cálcio e fosfolipídios e se encontra em grande quantidade no cérebro, tendo por função neste a regulação da excitabilidade neuronal, liberação de neurotransmissores, expressão gênica e plasticidade sináptica (Nishizuka, 1988). A ativação de PKC pode aumentar a liberação de neurotransmissores por mecanismos como o aumento na atividade dos canais de  $Ca^{2+}$ , a inibição dos canais de  $K^+$ , alterações na maquinaria de exocitose, aumento no *pool* de vesículas prontas, ou aumento da sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  da maquinaria de liberação (Giordano *et al.* 2005; Jung *et al.* 2005). Particularmente em relação à liberação de glutamato, além da atividade da PKC e PKA aumentar a liberação deste, também atuam inibindo as vias GABAérgicas inibitórias, assim sendo, ambas aumentam a atividade glutamatérgica (Sigel, 1995). Esse grupo de enzimas desempenha um papel importante na atividade de receptores de monoaminas ( $\alpha_1$ , 5-HT<sub>2A</sub> e 2C), colinérgicos (M1, M3 e M5), para vasopressina e substância P. Por último, é importante citar que a atividade da miricitrina é dada pela inibição da fosforilação da PKC e conseqüentemente inibição de sua ativação e translocação para o citosol (Meotti *et al.* 2006). A atividade da miricitrina se dá principalmente sobre os subtipos  $\epsilon$  e  $\alpha$  da PKC, que são os dois subtipos modulados pela atividade dos estabilizadores de humor, lítio e valproato (Manji *et al.* 1996; Meotti *et al.* 2006).

Portanto, baseado nas ações neuroquímicas da miricitrina, pode-se dizer que esta possui potencial antimaníaco, antidepressivo e antioxidante.

## 2. OBJETIVOS:

O presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do flavonóide miricitrina em testes de comportamento tipo maníaco e depressivo analisando algumas das possíveis alterações neuroquímicas associadas suas ações.

### 2.1 Objetivos gerais:

- ◆ Avaliação do potencial efeito antidepressivo e antimaníaco da miricitrina;
- ◆ Avaliação dos efeitos da miricitrina no sistema monoaminérgico, nas citocinas pró-inflamatórias e antioxidante.

### 2.2 Objetivos específicos:

Primeira fase: testes antimaníacos:

- ◆ Avaliar a ação tipo antimaníaca da miricitrina, utilizando modelos animais: hiperlocomoção induzida por anfetamina; hiperlocomoção induzida por privação de sono e análise de latência de sono após privação de sono e aumento da vocalização ultrasônica induzida por anfetamina;
- ◆ Avaliação do possível efeito antioxidante da miricitrina no hipocampo após privação de sono.
- ◆ Avaliação *in vitro* do efeito antioxidante da miricitrina no teste do DPPH (2,2-difenil-1picrylhydrazyl)

Segunda fase: testes antidepressivos:

- ◆ Avaliar a ação tipo antidepressiva da miricitrina no comportamentos tipo depressivos induzidos por modelo de estresse brando utilizando os seguintes testes animais: teste de preferência de sacarose; teste de nado forçado e teste de suspensão pela cauda.
- ◆ Avaliar o efeito da miricitrina na atividade motora de animais submetidos ao teste do campo aberto;
- ◆ Avaliação do efeito do tratamento com a miricitrina no aumento do estresse oxidativo induzido por estresse brando e imprevisível;

- ◆ Análise dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no hipocampo após estresse brando e imprevisível;
- ◆ Avaliação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos no estriado após estresse brando e imprevisível;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS**

Os materiais e métodos e resultados de cada fase (Fase I: avaliação do potencial antimaníaco; Fase II: avaliação do potencial antidepressivo) serão apresentados de maneira separada. Primeiramente será apresentada metodologia empregada nos testes de mania, bem como os resultados obtidos e posteriormente a metodologia e os resultados dos testes de depressão.

#### **3.1 ANIMAIS:**

O desenho experimental contou com a utilização de ratos (para teste de vocalização ultrasônica realizado na Alemanha no laboratório do professor Rainer Schwarting) e camundongos (para realização dos demais testes no laboratório de farmacologia do SNC na UFPR).

##### **3.1.1 Ratos:**

Foram utilizados ratos Wistar machos, entre 200-210 g, provenientes da empresa Harlan-Winkelmann (Alemanha). Os animais foram aclimatados no biotério da Phillip Universität Marburg, mantidos, em grupos, em caixas de polipropileno (até 5 animais em caixas de 41 x 34 x 16 cm) em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), com ciclo claro-escuro de 12 h (luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), com comida e água à vontade. (CEEA: 385b).

##### **3.1.2 Camundongos:**

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 30-40 g, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos, em grupos de até 20 animais por caixa, em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ), com ciclo claro-escuro de 12 h

(luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), com comida e água à vontade (CEEA: 385).

### **3.2. Drogas e tratamentos:**

- Tamoxifeno: 1 mg/kg: dissolvido em salina, administrado por via intraperitoneal (ip) (Sabione *et al.* 2008; Einat *et al.* 2007).
- Miricitrina - 10 e 30 mg/kg (fornecida pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, UFSC, extraída com grau de pureza de 98%, testado por análise em HPLC): dissolvida em Tween 80 e salina, e administrada por via ip (Meotti *et al.* 2006; Pereira *et al.* 2011).
- d-Anfetamina - 3 mg/kg (Sigma, EUA): empregada para indução de hiperlocomoção, foi dissolvida em salina, administrada por subcutânea (sc) (Sabione, *et al.* 2008); 2,5 mg/kg (Sigma, EUA): empregada para indução de hiperlocomoção e hipervocalização, foi dissolvida em salina, administrada por sc (Natusch and Schwarting, 2010);.
- Carbonato de Lítio - 100 mg/ kg (Eurofarma, Brasil): empregado como controle positivo nos modelos de mania, foi dissolvido em salina, tendo seu pH ajustado para 7.4 pela adição de HCl 2N (Sabione, *et al.* 2008), e administrado por via ip.
- Imipramina - 20 mg/ kg (Sigma, EUA): empregada como controle positivo nos modelos de depressão, foi dissolvida em água destilada e administrada por via ip.

As doses propostas foram baseadas em estudos anteriores em nosso laboratório (imipramina: Skalisz *et al.* 2004; anfetamina, tamoxifeno e lítio: Sabioni *et al.* 2008; miricitrina: Pereira *et al.* 2011) e no laboratório do Prof. Schwarting (Natusch and Schwarting, 2010). Todas as drogas foram administradas em volume constante de 1 ou 10 ml/kg, de acordo com o animal a ser utilizado (rato ou camundongos respectivamente), de peso corporal.

## **4 PRIMEIRA FASE: TESTES DE MANIA**

### **4.1 Testes comportamentais:**

#### **4.1.1 Teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina:**

O teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina foi feito com camundongos. A atividade locomotora dos animais foi medida em uma caixa de madeira (40x20x26cm), com piso de tela de arame, equipada com três sensores fotoelétricos em seu interior (10 cm de distância entre cada sensor). Foram realizados três dias de teste, sendo que cada teste durou vinte minutos e após este período, a taxa de locomoção foi anotada (numero de cruzamentos no sensor fotoelétrico). Os dois primeiros dias foram para a habituação dos animais ao ambiente de teste, sendo que somente no terceiro dia os animais receberam tratamento e foram testados. No dia do teste, após a habituação de meia hora na sala experimental, os animais receberam a primeira droga (miricitrina, lítio, tamoxifeno ou salina), quinze minutos depois o segundo tratamento (anfetamina ou salina). Após mais vinte minutos os animais foram colocado na caixa de movimentação por 20 minutos de teste, conforme esquema abaixo (fig.2). Ao término do tempo, o animal foi recolocado em sua gaiola.



Fig. 2: Esquema de teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina.

O número de cruzamentos foi considerado como índice de locomoção, sendo que seu aumento após a administração de anfetamina foi tido como indicativo de efeito estimulante e a inibição de tal locomoção pela droga testada como indicativo de efeito tipo antimaníaco (Gould *et al.* 2001; Sabioni *et al.* 2008). Este efeito só é considerado como tipo antimaníaco quando a droga, na ausência de anfetamina, não altera a atividade locomotora em comparação ao controle.

#### 4.1.2 Teste de hiperlocomoção induzida por privação de sono:

Os camundongos foram submetidos ao método de privação de sono por 24h utilizando plataformas múltiplas (Silva *et al.* 2004). Resumidamente, 4-6 camundongos foram colocados em uma caixa de polipropileno (41x34x16cm) com

12 plataformas de cimento (3 cm de diâmetro por 5cm de altura) e preenchida com 1 cm de água. Ração e água foram ofertados à vontade na grade superior da caixa. Os animais passaram por uma análise basal da taxa de locomoção, sendo, para tanto, mantidos na caixa de locomoção por 20 minutos. Após este período os animais foram tratados com as drogas teste: miricitrina, lítio, tamoxifeno ou veículo. Os animais foram mantidos em regime de privação de sono por um intervalo de 24 h, sendo novamente tratados com as drogas acima citadas trinta minutos antes do final da privação e ao término desta foram expostos novamente à caixa de locomoção por 20 minutos, sendo medida ainda a latência de sono. A medição da latência de sono é feita pela cronometragem de tempo (em minutos) desde que o animal foi colocado em uma caixa viveiro até o momento em que dormiu (parou de se locomover e esta quieto em um canto por mais de 20 segundos). O esquema do experimento é mostrada na figura abaixo (fig.3). A diminuição da movimentação, bem como da latência de sono em relação ao grupo controle, foi tomada como ação antimaníaca da droga.



Fig.3: Esquema do teste hiperlocomoção induzida por privação de sono.

#### 4.1.3 Análise da reversão das alterações na vocalização ultrasônica induzidas por anfetamina:

Os ratos foram testados quando à capacidade da miricitrina em reverter a alta incidência de vocalizações específicas relacionadas ao tratamento com psicoestimulantes, no caso a anfetamina. Ratos tratados com anfetamina apresentam um aumento do número de vocalizações de alta frequência (50kHz), que pode ser relacionado com comportamento normal frente a estímulos reforçadores positivos (Cruz *et al.* 1997; Burgdorf *et al.* 2001; Natusch *et al.* 2008; Wöhr e Schawarting, 2009). Existem dois subtipos de vocalizações de alta



antes do teste; e somente no terceiro dia os animais foram previamente tratados com miricitrina, lítio, tamoxifeno ou salina e após vinte minutos eles receberam anfetamina ou salina. Cumpridos quinze minutos da aplicação da anfetamina os animais foram testados. A análise da locomoção foi monitorada por sensores fotoelétricos e analisada pelo software TruScan (Photo beam Sensor-E63-22, Coulbourn Instruments, PA, USA), que automaticamente calcula a locomoção do animal. O esquema de teste foi feito de acordo com a figura abaixo:

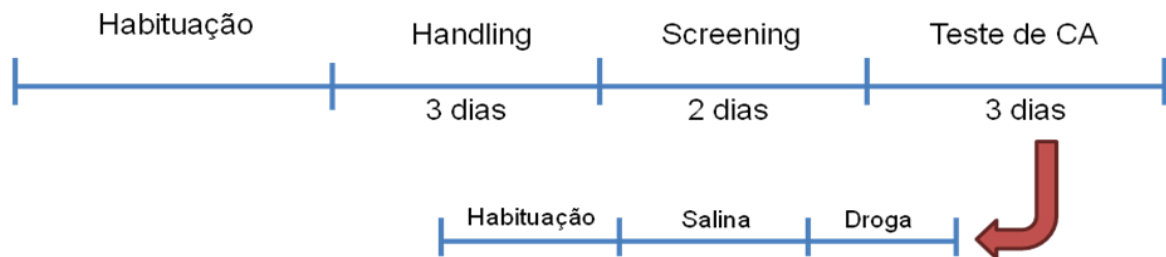


Fig.5: Esquema de protocolo do teste de reversão das alterações na vocalização ultrasônica induzidas por anfetamina.

Em relação à vocalização, um microfone apropriado para captura de vocalização ultrasônica, o UltraSoundGate Condenser Microphone CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) foi colocado a 45 cm do chão. Este microfone é sensível a frequências entre 15-180 kHz, sendo que a vocalização do animal foi gravada pelo programa Avisoft RECORDER (versão 2.95; Avisoft Bioacoustics) e posteriormente analisada. Para a análise a gravação foi transferida para o software Avisoft SASLab Pro (version 4.34; Avisoft Bioacoustics) que produziu um espectrograma (com frequência de 488 Hz e resolução de 0,512 ms) a partir da gravação das vocalizações emitidas pelo animal que foi posteriormente analisado manualmente (Portifors, 2007; Sadananda *et al.* 2008; Wöhr *et al.* 2008).

## 4.2 Análises neuroquímicas:

### 4.2.1 *Análise in vitro da atividade da miricitrina, lítio e tamoxifeno no ensaio do DPPH:*

A reatividade da miricitrina, lítio e tamoxifeno (concentrações de 10-1,000 mg·ml<sup>-1</sup>) com o radical livre estável 2,2-difenil-1picrylhydrazyl (DPPH) foi



determinada “*in vitro*” de acordo com o método descrito por Chen e colaboradores (1999), com algumas modificações. O ensaio consistiu em 750 µL da solução de teste (miricitrina, lítio ou tamoxifeno) e 250µl de uma solução metanólica de DPPH (1 mg em 25 ml). Após 5 min, mediu-se o decréscimo da absorbância. O ácido ascórbico (50 mg.ml<sup>-1</sup>), foi utilizado como controle positivo, e água destilada, foi utilizado como controle negativo. Nesse ensaio é avaliada a capacidade de substâncias com potencial efeito antioxidante em sequestrar o radical livre do DPPH e com isso ocorre alteração da absorbância de acordo com a capacidade antioxidante da substância.

#### 4.2.2 *Análise do estresse oxidativo (LPO) no hipocampo após a privação de sono*

Estudos prévios observaram alterações nos níveis de GSH (glutathiona) e LPO (peroxidação lipídica) nos cérebros (hipocampo e córtex pré-frontal) de camundongos após estes serem submetidos à hiperlocomoção induzida por amfetamina (Frey *et al.* 2006). No presente trabalho, para medir possível alteração nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) os animais foram sacrificados após o teste de privação de sono e seus hipocampos coletados e mantidos congelados a -80° C para posterior análise. As amostras de hipocampo foram homogeneizadas e centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 min. A homogeneização foi realizada em gelo e com centrífuga refrigerada a 4° C. A análise dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) foi feita utilizando o método de FOX (oxidação ferrosa em laranja xileno), seguindo um protocolo estabelecido por Jiang e colaboradores (1991) e também normalizada por gramas de tecido. Brevemente este método se baseia na oxidação do Fe<sup>2+</sup> (sulfato ferroso amoniacal) a Fe<sup>3+</sup> por hidroperóxidos em meio ácido, assim sendo, em meio ácido e na presença de hidroperóxidos presentes na amostra, o ferro será oxidado e reagirá com o laranja xileno formando um composto azul-púrpura e sua absorbância será proporcional à quantidade de hidroperóxido presente na amostra.

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via (latência de sono, DPPH e LPO) ou duas vias (hiperlocomoção induzida por anfetamina e por privação de sono e aumento do número de vocalizações induzida por anfetamina), seguido do *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Os dados foram expressos como média+EPM. O nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) foi considerado estatisticamente significativo em todos os dados analisados.

## **5 RESULTADOS NOS TESTES DE MANIA**

### 5.1 Testes comportamentais

#### *5.1.1 Teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina*

Neste teste procurou-se avaliar se a miricitrina seria efetiva na reversão da hiperlocomoção induzida por anfetamina. Duas doses de miricitrina foram utilizadas (10 e 30mg/kg) e como controle positivo as drogas utilizadas foram o lítio (100mg/kg) e o tamoxifeno (1mg/kg). Tanto drogas utilizadas como controle positivo quanto a miricitrina (em ambas as doses) foram efetivas em reverter a hiperlocomoção induzida por anfetamina (3 mg/kg). A ANOVA indicou um efeito do: fator tratamento (lítio [ $F_{3,24}=11,40$ ;  $p<0.001$ ]; tamoxifeno [ $F_{3,24}=3,98$ ;  $p<0.01$ ]; miricitrina [ $F_{5,40}=2,77$ ;  $p<0.05$ ]), fator tempo (lítio [ $F_{2,48}=44,76$ ;  $p<0.001$ ]; tamoxifeno [ $F_{2,48}=11,87$ ;  $p<0.001$ ]; miricitrina [ $F_{2,80}=20,88$ ;  $p<0.001$ ]), uma vez que os animais foram submetidos a três exposições à caixa de locomoção; e da interação entre o tratamento e o tempo de experimento (lítio [ $F_{6,48}=49,03$ ;  $p<0.001$ ]; tamoxifeno [ $F_{6,48}=19,90$ ;  $p<0.001$ ]; miricitrina [ $F_{10,80}=15,73$ ;  $p<0.001$ ]) (Fig.6 A,B,C).

#### *5.1.2 Teste de hiperlocomoção induzida por privação de sono*

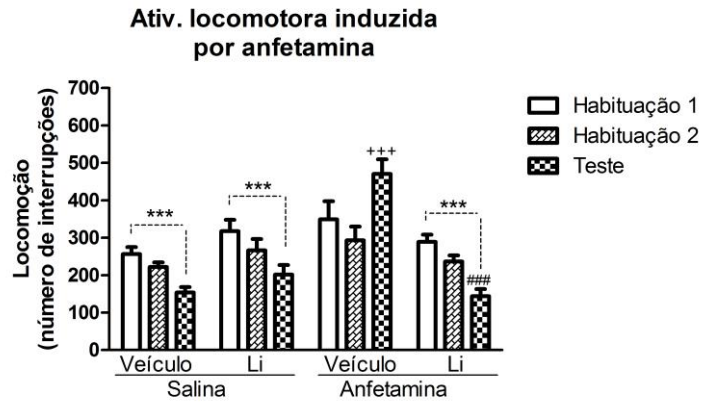
Este teste teve como objetivo avaliar se a miricitrina seria efetiva na reversão da hiperlocomoção induzida por privação de sono. A menor dose de miricitrina efetiva no teste de hiperlocomoção por anfetamina foi utilizado (10mg/kg). Como controle positivo as drogas utilizadas foram o lítio (100mg/kg) e o tamoxifeno (1mg/kg). Observou-se que os controles positivos foram efetivos em reverter a

hiperlocomoção induzida por privação de sono, bem como a miricitrina. Quanto à redução da latência de sono, porém, somente o lítio e a miricitrina se mostraram efetivos. Na hiperlocomoção a ANOVA mostrou efeito significativo no: fator tratamento ( $F_{7,59}=2,93$ ;  $p<0.01$ ), no fator tempo ( $F_{1,59}=3,94$ ;  $p<0.05$ ), uma vez que os animais foram submetidos a duas exposições à caixa de locomoção, na interação entre os tratamentos e tempo ( $F_{7,59}=27,46$ ;  $p<0.001$ ) (Fig.7A). Na latência de sono foi utilizada ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* de Tukey:  $F_{3,30}=30,78$ ;  $p<0.001$  (Fig.7B).

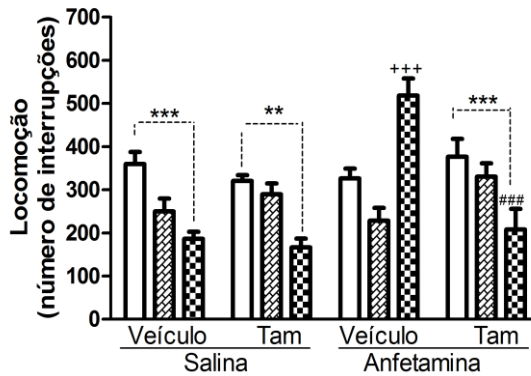
### 5.1.3 Teste de vocalização ultrasônica induzida por anfetamina em ratos

Neste teste foi avaliada a capacidade do lítio, do tamoxifeno e da miricitrina em inibir a vocalização apetitiva (50kHz) em ratos tratados com anfetamina. Primeiramente foi realizado um teste somente com as drogas controle e semelhante à locomoção (dados não mostrados), as vocalizações de 50 kHz induzidas por anfetamina foram bloqueadas pelo tratamento com lítio ou tamoxifeno; A ANOVA de duas vias, seguida de *post-hoc* de Tukey, mostrou que os dados apresentaram significância quanto a: fator tratamento ( $F_{1,41}=10,62$ ;  $p=0,0001$ ); fator tempo ( $F_{1,41}=23,65$ ;  $p=0,0001$ ) e fator interação ( $F_{5,41}=15,69$ ;  $p=0,0001$ ). (Fig.8A). Posteriormente foram realizados testes com a miricitrina, em duas diferentes doses (10 e 30mg/kg) e a análise dos dados obtidos mostrou que ambas as doses foram efetivas em reverter o aumento da vocalização induzido por anfetamina. Fator tratamento ( $F_{1,41}=8,34$ ;  $p=0,0001$ ); fator tempo ( $F_{1,41}=91,02$ ;  $p=0,0001$ ) e interação ( $F_{5,40}=26,39$ ;  $p=0,0001$ ). (Fig.8B).

A



B



C

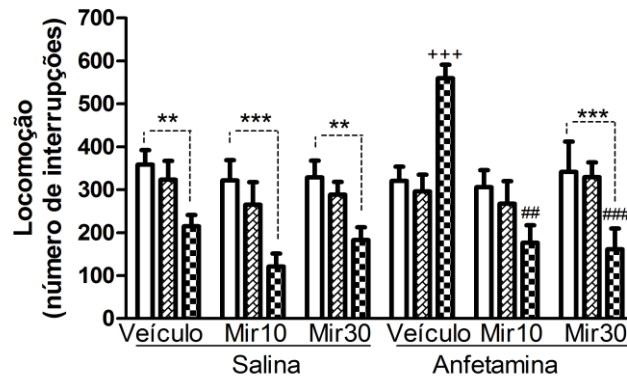
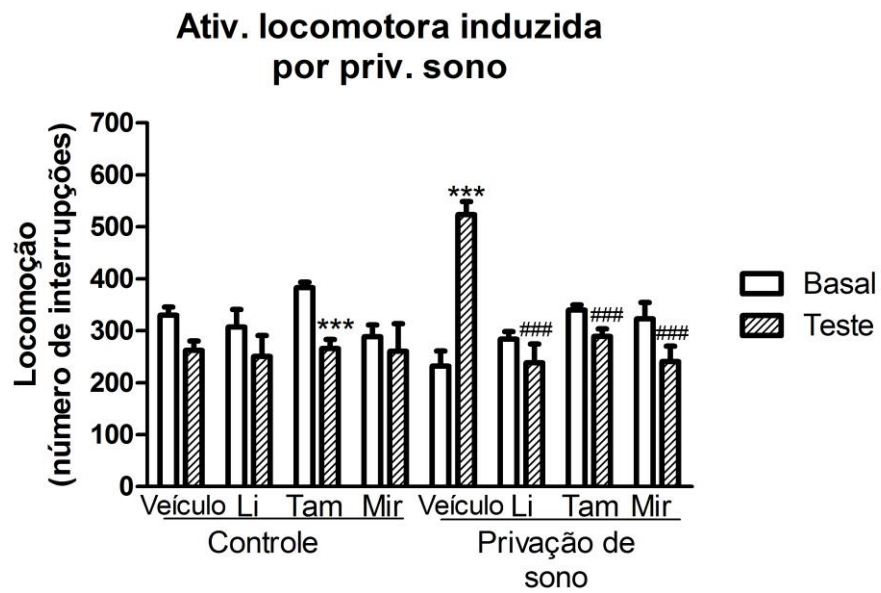


Fig. 6: Efeito do lítio (100mg/kg) (A); tamoxifeno (1mg/kg) (B) e miricitrina (10 e 30mg/kg) (C) na hiperlocomção induzida por anfetamina (3mg/kg). n=7-9 camundongos/ grupo; Dados representam média+epm do número de interrupções do sensor fotoelétrico. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 - comparado ao primeiro dia de habituação; +++p<0.001- comparado ao grupo controle – salina+veículo; ##p<0.01; ###p<0.001 - comparado ao grupo– salina+anfetamina.

A



B

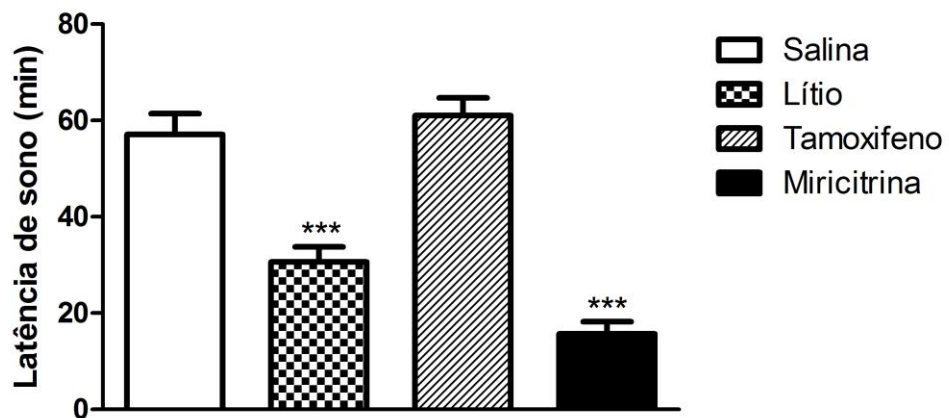


Fig. 7: Efeito do lítio (100mg/kg); tamoxifeno (1mg/kg) e miricitrina (10mg/kg) na (A) hiperlocomoção induzida por privação de sono (B) latência de sono após privação de sono. n=7-9 camundongos/grupo; Dados representam média+epm do número de interrupções do sensor fotoelétrico. \*\*\*p<0.001 - comparado ao primeiro dia de habituação (A) ou com o grupo salina (B); ###p<0.001 - comparado ao grupo- salina+privação de sono (A).

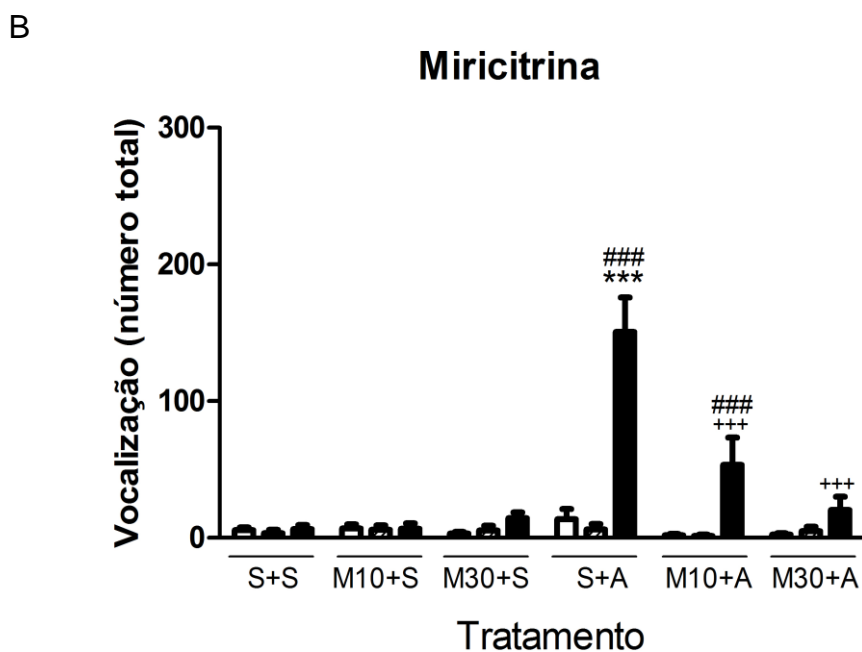
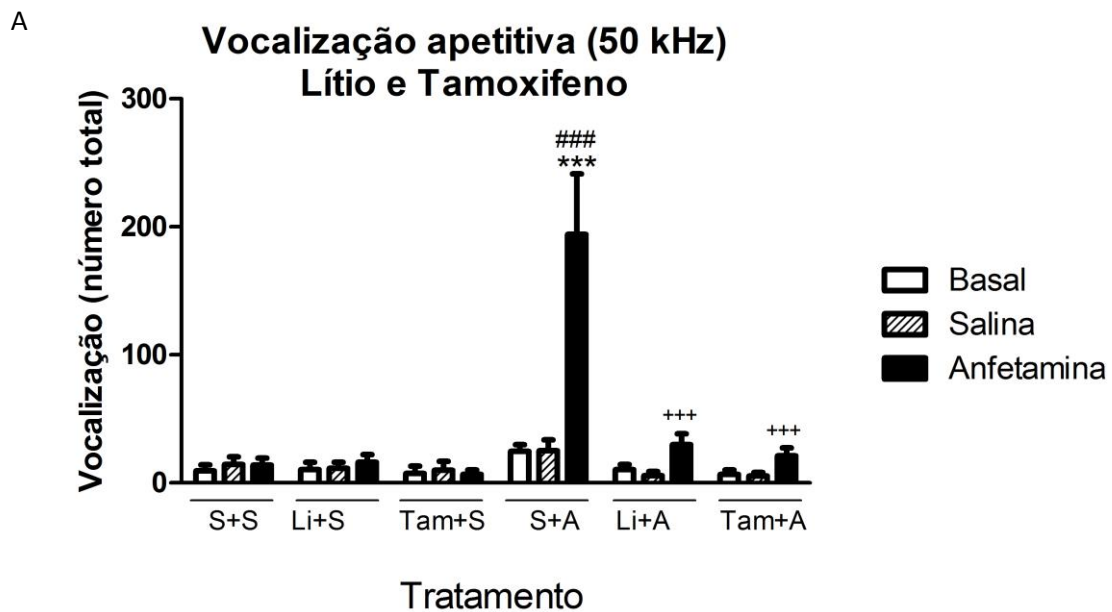


Fig. 8: Efeito do (A) lítio (100mg/kg) e tamoxifeno (1mg/kg) e (B) miricitrina (10 e 30mg/kg) no aumento da vocalização apetitiva (50kHz) induzida por anfetamina (2,5 mg/kg). n=7-8 ratos/ grupo; valor expresso em número total de vocalizações. \*\*\*p<0.001 - comparado ao grupo controle; ###p<0.001 - comparado segundo dia de habituação; +++p<0.001 - comparado ao grupo salina+anfetamina.

## 5.2 Ensaio neuroquímicas:

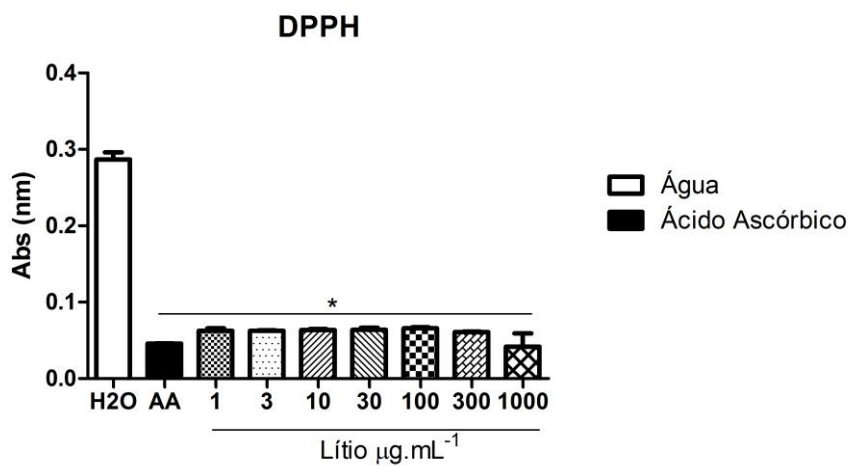
### 5.2.1 *Análise da atividade da miricitrina, lítio e tamoxifeno no ensaio do DPPH.*

O primeiro teste para avaliar a possível capacidade antioxidante da miricitrina foi o teste de DPPH, sendo também testados o lítio e o tamoxifeno. Neste teste foram comparadas diferentes concentrações de miricitrina, lítio e tamoxifeno (todos 1-1000 µg/ml) com uma concentração eficaz de ácido ascórbico (1 µg/ml). Os dados obtidos nestes testes indicam um efeito antioxidante para as três drogas. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento para miricitrina ( $F_{8,26}=524,7$ ;  $p<0.001$ ); lítio ( $F_{8,26}=128,0$ ;  $p<0.001$ ); tamoxifeno ( $F_{8,25}=152,2$ ;  $p<0.001$ ) (Fig.9 A, B e C).

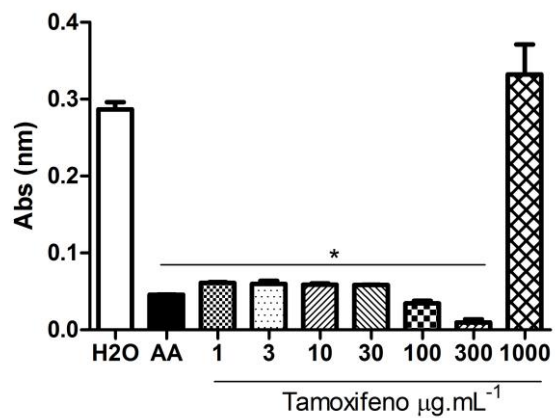
### 5.2.2 *Análise do estresse oxidativo (LPO) no hipocampo após privação de sono:*

Foi realizado um teste de privação de sono de 24 horas e posteriormente os animais foram sacrificados e seu hipocampo foi dissecado para a mensuração dos níveis de peroxidação lipídica. Neste teste procurou-se avaliar se a miricitrina (10mg/kg), lítio (100mg/kg) e o tamoxifeno (1mg/kg) seriam efetivos em reverter os índices de peroxidação lipídica no hipocampo (indicativo de estresse oxidativo), que de acordo com a literatura se encontram aumentados. As análises dos resultados obtidos indicam um efeito do tratamento ( $F_{7,29}=6,06$ ;  $p<0.001$ ) (Fig.10), sendo que apenas o tamoxifeno e a miricitrina reduziram a peroxidação lipídica em relação ao grupo privado de sono e tratado com salina.

A



B



C

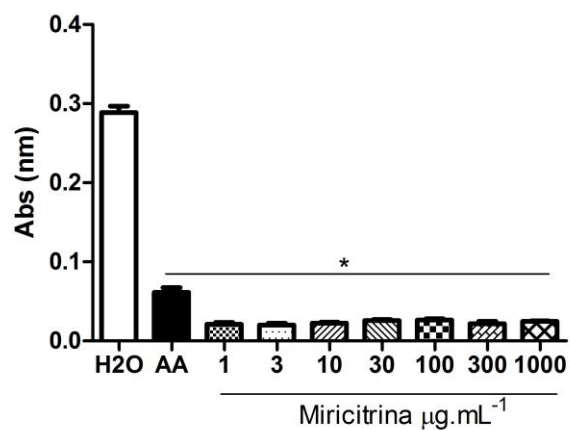


Fig. 9: Efeito do lítio (A), tamoxifeno (B), miricitrina (C), da água (controle negativo) e do ácido ascórbico (controle positivo) na atividade de sequestro de radicais livres pelo ensaio de DPPH. Ensaio realizado em triplicata. \*p<0.05- comparado ao grupo controle negativo (tratado com água).



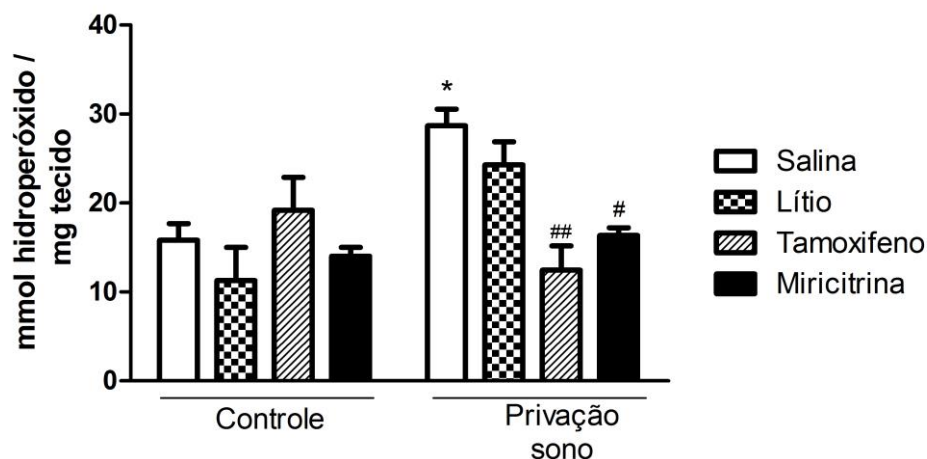


Fig. 10: Efeito do lítio (100mg/kg); tamoxifeno (1mg/kg) e miricitrina (10mg/kg) na reversão do aumento da peroxidação lipídica causada por privação de sono. n=5-7 camundongos/ grupo; \*p<0.05-comparado ao grupo controle tratado com salina; #p<0.05; ##p<0.01 - comparado ao privado de sono e tratado com salina.

## 6 SEGUNDA FASE: TESTES DE DEPRESSÃO

### 6.1 Modelos comportamentais:

#### 6.1.1 Anedonia induzida por estresse brando repetido e imprevisível:

Os camundongos foram divididos em dois grupos, estressados e não estressados, de acordo com os pares de animais estabelecidos pelo teste de preferência de sacarose (detalhado no tópico seguinte).

As baterias de estresse foram iniciadas em horários diferentes do dia, para evitar que o animal se habituasse a um horário específico de manipulação e com isso não desenvolvesse a anedonia. Os animais foram expostos diariamente a diferentes tipos de estresse, sendo que cada semana a bateria era alterada para que o animal não se acostumasse com uma seqüência de estressores. Os estresses a que os animais foram submetidos eram: caixa inclinada, exposição à claro constante (24h), exposição a escuro constante (24h), privação de água (máximo de 18h), privação de comida (máximo de 18h) e cepilho úmido (24h) (Monleon *et al.* 1995; Willner, 2005). Estas baterias de estresse foram realizadas por 5 semanas consecutivas para indução de anedonia e mais duas semanas posteriores para

reversão da anedonia pelo tratamento (imipramina ou miricitrina).

Após os animais apresentarem anedonia induzida por estresse brando, detectada pelo teste de preferência de sacarose, eles foram submetidos ao teste de nado forçado (detalhado no tópico 6.1.4) e de campo aberto (detalhado no tópico 6.1.3) ou suspensão pela cauda (detalhado no tópico 6.1.5) e campo aberto para estabelecimento basal desses parâmetros. Foi realizada separadamente a indução da anedonia para o teste de suspensão pela cauda e de nado forçado, sendo então que em ambos foi feito o teste de campo aberto. Então, animais foram tratados diariamente por 14 dias com diferentes drogas, sendo que durante este intervalo eles eram submetidos semanalmente aos testes de nado forçado e campo aberto para avaliar se ocorre alteração comportamental em decorrência do tratamento. Durante todo este período as baterias de estresses eram mantidas, de acordo com o esquema abaixo:

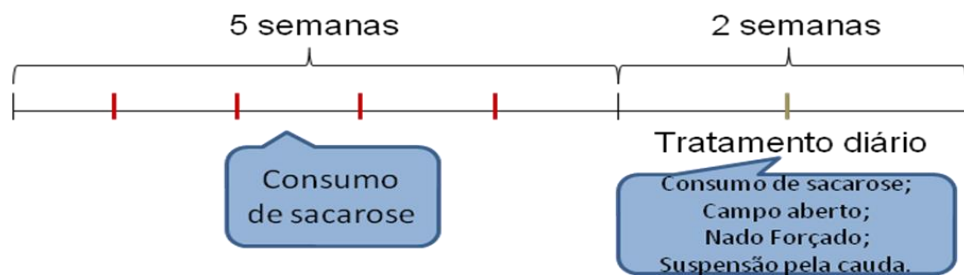


Fig. 11: Esquema de bateria de estresse bando e subsequentes testes comportamentais.

Os tratamentos foram realizados com as seguintes drogas: miricitrina (10mg/kg), imipramina (20mg/kg) e salina, sendo que a distribuição para os tratamentos foi feita de maneira randomizada tanto para animais estressados quanto para os não estressados.

### 6.1.2 Teste de preferência de sacarose:

Os camundongos foram submetidos a duas exposições à sacarose e a partir de seu consumo da segunda exposição foi feita a separação dos animais em duplas (pareamento), a partir da similaridade de preferência. Em seguida estas duplas foram randomizadas entre animal controle e submetido a estresse. Posteriormente os animais eram expostos a baterias de estresse brando repetido e a diminuição da

preferência de sacarose tomada como indicativo de anedonia nos animais, sendo que a bateria e os testes de preferência de sacarose foram realizados por cinco semanas consecutivas até o estabelecimento da anedonia. Após a análise estatística e a comprovação da indução de anedonia nos animais estressados, os camundongos foram divididos entre diferentes tratamentos que duraram 14 dias para análise da capacidade da droga de reverter a anedonia (administração diária).

A análise da preferência de sacarose foi feita com base no protocolo modificado a partir do teste proposto por Monleon e colaboradores (1995). O primeiro passo foi o estabelecimento da melhor concentração de sacarose para a aplicação do teste em nosso plantel de camundongos. As concentrações utilizadas foram de 0,5% a 3% e a partir da curva de preferência dos animais, concentração de sacarose foi escolhida. Optou-se pela menor dose que apresentou diferença em relação à água, pois teria menor efeito reforçador e seria possível reverter por estresse brando. Os camundongos foram expostos à solução por 24 h, sendo que os animais não eram privados de água e nem de comida para a realização do teste. Os bebedouros contendo água ou sacarose foram pesados previamente e após 24 h foram novamente pesados e o cálculo para o consumo de sacarose, dado pela seguinte equação:

$$\% \text{ preferência de sacarose} = \frac{\text{consumo de sacarose} \times 100}{\text{Consumo total (H}_2\text{O} + \text{sacarose)}}$$

### *6.1.3 Teste de campo aberto:*

O aparato experimental é construído com piso de madeira e paredes de aço escovado com 50 cm de altura delimitando uma área circular de 1 m de diâmetro sendo o assoalho pintado de branco, subdividido com linhas pretas traçadas através de dois círculos concêntricos com várias linhas radiais formando figuras semelhante a trapézios. Cada camundongo foi colocado no centro da arena e o seu comportamento quantificado durante 5 minutos. Os parâmetros registrados foram os seguintes: número de quadrantes cruzados na área central (ambulação central) e na periferia (ambulação periférica). Este teste foi empregado no intuito de avaliar se as drogas utilizadas não afetam a atividade locomotora dos animais (Cunha e Masur, 1978).

#### 6.1.4 Teste de nado forçado:

Os animais foram habituados à sala de experimentação por 30 minutos e após este período os animais foram colocados no centro de um cilindro de vidro (5 x 22,5 cm) preenchido com 19 cm de água a aproximadamente  $24 \pm 2$  °C, sendo medido o tempo de imobilidade nos últimos 4 minutos, de um total de 6 minutos de teste (Porsolt *et al.* 1978; Borsini e Meli, 1988; Skalisz *et al.* 2004; Raupp *et al.* 2008). O animal foi julgado imóvel quando parava de nadar e executava movimentos mínimos apenas para permanecer flutuando com a cabeça acima do nível da água. A água era trocada após o teste de cada animal e então era secado e colocado em ambiente aquecido após o teste. Os camundongos foram testados em 3 momentos: antes do início do tratamento (basal), após 1 e 2 semanas de tratamento. Foi considerado efeito antidepressivo quando a redução do tempo de imobilidade ocorra com a dose que não aumentou a atividade locomotora (Porsolt *et al.* 1978; Borsini e Meli, 1988).

#### 6.1.5 Teste de suspensão pela cauda:

O protocolo de teste foi uma adaptação do trabalho de Steru e colaboradores (1985). Os animais estressados e seus controles não estressados passaram por 2 exposições ao teste de suspensão pela cauda, uma após a indução da anedonia e uma após 14 dias de tratamento com imipramina, miricitrina ou salina (tratamento realizado diariamente). Nos dias dos testes, os camundongos eram habituados à sala de teste por meia hora e em seguida, submetidos ao teste individualmente.

Neste teste é analisado o tempo total de imobilidade do animal em um total de 6 minutos de teste. No teste, os camundongos são isolados em uma plataforma sendo suspensos pela cauda a uma altura de 50 cm do chão, utilizando uma fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. É proposto que substâncias com atividade antidepressiva diminuem o tempo de imobilidade dos animais, sem alterar a sua atividade locomotora (Cryan *et al.* 2002).

### 6.1.6 *Pesagem da glândula adrenal*

Após o sacrifício dos animais submetidos ao modelo de anedonia induzida por estresse brando e repetido e submetidos à bateria de suspensão pela cauda, as glândulas adrenais foram retiradas e pesadas, sendo posteriormente calculado o peso relativo (peso órgão / peso animal).

## 6.2 Ensaio neuroquímico:

### 6.2.1 *Dosagens de monoaminas no estriado:*

Os camundongos submetidos ao modelo de estresse brando (animais controle e animais estressados) foram sacrificados, por decapitação, após o término dos experimentos e a região de interesse (estriado) foi dissecada em gelo e congelada para posterior análise a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Estes animais foram os submetidos à bateria que contava com o teste de nado forçado. O hipocampo também foi retirado para análise de interleucinas. As amostras foram homogeneizadas por ultrassom em ácido perclórico 0,1M e injetadas em uma estação de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) Shimadzu (Japão) com uma coluna C18 de fase reversa Varian (Art. 1215-9012; d.i.:150 x 4,6 mm, partículas de  $5\mu\text{m}$ , um detector amperométrico (ESA) fixado em + 0,85V. Nesse sistema, foi feita a dosagem da monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina), como descrita por Ferro e colaboradores (2005).

### 6.2.2 *Análise da alteração dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando:*

Como mencionado anteriormente, parece haver um aumento de IL-1 e TNF- $\alpha$  em pacientes depressivos e, portanto avaliou-se os níveis destas citocinas no hipocampo dos camundongos. Os camundongos foram decapitados e o hipocampo foi dissecado (metade dos camundongos de cada grupo experimental) para ensaio de Elisa para medição dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Monje *et al.*, 2011). O protocolo experimental em si, para quantificação, foi similar ao descrito por Monje e colaboradores (2011). As amostras foram retiradas e estocadas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$

para posterior análise, posteriormente elas foram maceradas e acrescidas de solução para reagente (1% de BSA em PBS, pH = 7,2). Posteriormente as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 10.000g) e o sobrenadante recolhido. No ensaio foram utilizados anticorpos de captura e anticorpos de detecção específicos para detecção de TNF e IL-6 (anti-mouse TNF e anti-mouse IL-6, respectivamente). Basicamente o anticorpo de captura é incubado *overnight* no dia seguinte são acrescidas as amostras e o anticorpo de detecção, em períodos de tempo específico e as amostras são lidas a 450-570nm.

### 6.2.3 *Análise do estresse oxidativo (GSH e LPO) no SNC camundongos submetidos ao modelo de estresse brando:*

Para medir a atividade antioxidante das drogas, os animais submetidos ao teste de suspensão pela cauda, foram sacrificados após o teste e seus cérebros foram coletados e homogeneizados, sendo posteriormente centrifugados a 13.000 rpm durante 20 min. A homogeneização foi realizada em gelo e com centrífuga refrigerada a 4°C. Os ensaios foram realizados a partir do sobrenadante coletado. Para as medições da taxa de peroxidação lipídica (LPO) foi utilizado o método de FOX, seguindo o protocolo de Jiang e colaboradores (1991), descrito anteriormente (4.2.2). A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi medida com base na técnica descrita por Sedlak e Lindsay (1968), com modificações, na qual se determina teor dos grupos sulfidrílicos não proteicos. Os resultados foram expressos por gramas de tecido para LPO e GSH.

### 6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via (peso relativo da adrenal, dosagem de monoaminas, concentração de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo) ou duas vias (anedonia medida por preferência de sacarose, nado forçado, suspensão pela cauda e campo aberto), seguido do *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas ou teste t de Student (preferência de sacarose durante indução de anedonia por estresse brando e repetido). Os dados expressão média+EPM. O nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado estatisticamente significativo em todos os dados analisados.

## 7 RESULTADOS NOS TESTES DE DEPRESSÃO

### 7.1 Testes comportamentais

#### 7.1.1 *Teste de preferência de sacarose*

Primeiramente foi realizado um teste basal para a determinação da melhor concentração de sacarose a ser empregada nos testes subsequentes de anedonia induzida por estresse brando. Foi estabelecido que a melhor concentração seria a menor concentração que apresentasse preferência. Foram empregadas concentrações crescentes de sacarose (0,5 a 3%). Os dados foram tabulados e uma curva de preferência foi criada. A partir desta curva, a concentração escolhida foi a de 1%. (Fig. 12).

Posteriormente os animais foram submetidos a cinco semanas de estresse brando e repetido para a indução da anedonia. A partir da preferência de sacarose basal os animais foram randomizados em grupo controle e grupo estresse e semanalmente foi realizado o teste de preferência de sacarose como parâmetro para análise da anedonia dos animais. Os dados obtidos demonstram que o estresse brando e repetido foi efetivo em induzir comportamento tipo anedônico nos animais após quatro semanas de exposição. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa nas duas últimas semanas de indução de anedonia ( $t=3,78$ ;  $p<0,001$ ) e ( $t=5,75$ ;  $p<0,001$ ) respectivamente. (Fig. 13).

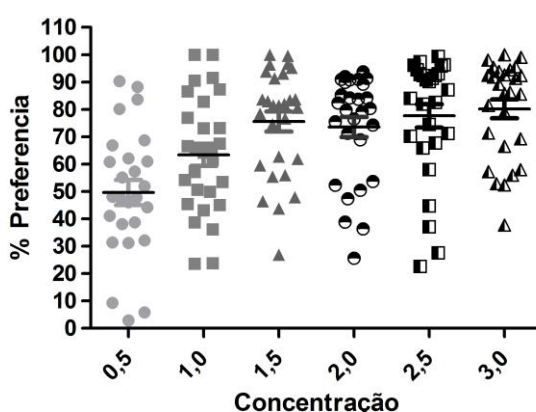


Fig. 12: Estabelecimento de concentração ideal de sacarose para teste de preferência de sacarose para determinação da melhor concentração a ser empregada (concentrações crescentes de 0,5-3,0%) n=27-28 camundongos/ grupo. Cada ponto simboliza um animal e o traço a média+epm da % de preferência em cada concentração de sacarose.

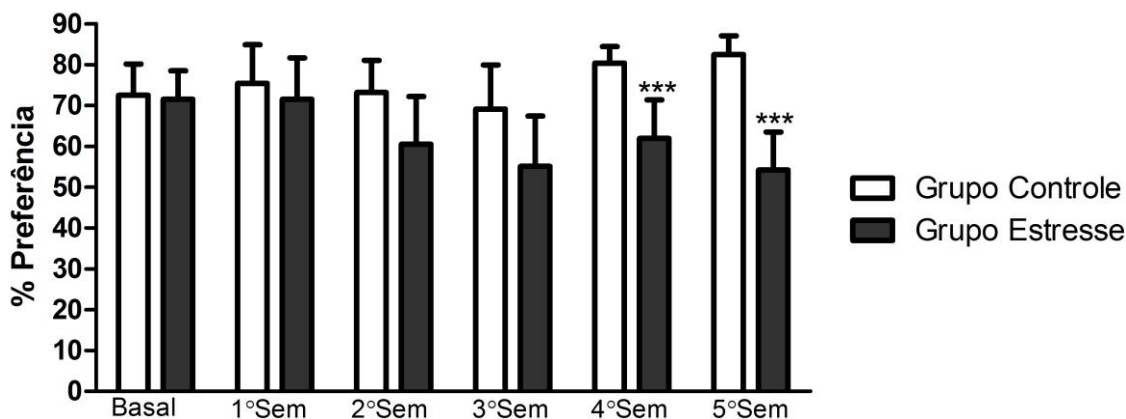


Fig. 13: Avaliação da indução da anedonia por estresse brando e repetido utilizando o teste de preferência de sacarose; Dados representam % de preferência de sacarose, média+EPM. n=7-8 camundongos/grupo \*\*\*p<0.001-comparado ao grupo controle no mesmo dia.

Em uma última etapa, foi analisada a capacidade da miricitrina (10mg/kg) em reverter o comportamento anedônico dos animais. Como controle positivo foi utilizada a imipramina (20mg/kg). Os dados obtidos demonstraram que ambas as drogas foram efetivas em reverter o comportamento tipo anedônico induzido pelo estresse brando após a segunda semana de tratamento. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5.29}=11,81$ ;  $p<0.001$ ); fator tempo ( $F_{2.58}=6,66$ ;  $p<0.002$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{10.58}=7,23$ ;  $p<0.001$ ) (Fig.14).

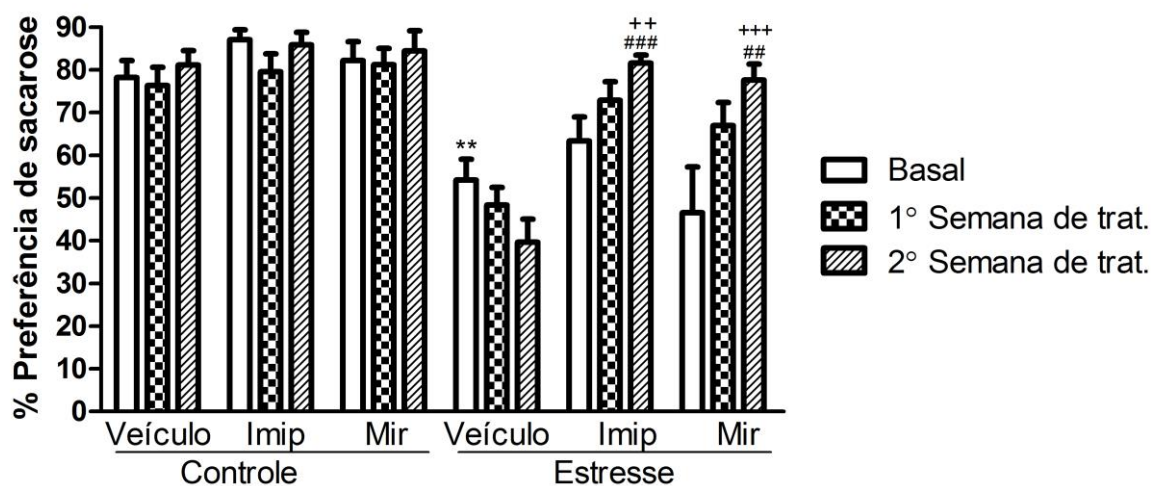


Fig. 14: Avaliação da reversão de anedonia induzida por estresse brando e repetido após tratamento por 14 dias com imipramina (20 mg/kg) ou miricitrina (10 mg/kg) (IP); Dados representam % de preferência de sacarose, média+EPM. n=7-8 camundongos/grupo. \*\*p<0,01 - comparado com o controle salina; ##p<0,01 e ###p<0.001 - comparado com ele mesmo no teste basal; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0.001 - comparado ao estresse tratado com salina.



### 7.1.2 Teste de campo aberto

A próxima análise comportamental realizada com estes animais foi o teste de campo aberto para averiguação de um possível efeito motor decorrente dos tratamentos, o que poderia produzir falsos resultados nos testes de depressão. Os animais foram submetidos em três diferentes momentos ao teste de campo aberto, cada exposição com duração de cinco minutos. A primeira exposição foi na quinta semana de exposição ao estresse brando, a seguinte após uma semana de tratamento e a terceira na segunda semana de tratamento. Como pode ser observado não ocorreu alteração motora em consequência aos tratamentos administrados. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,29}=1,34$ ;  $p<0,27$ ); fator tempo ( $F_{2,58}=9,21$ ;  $p<0.001$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{10,58}=0,95$ ;  $p<0.49$ ) (Fig.15).

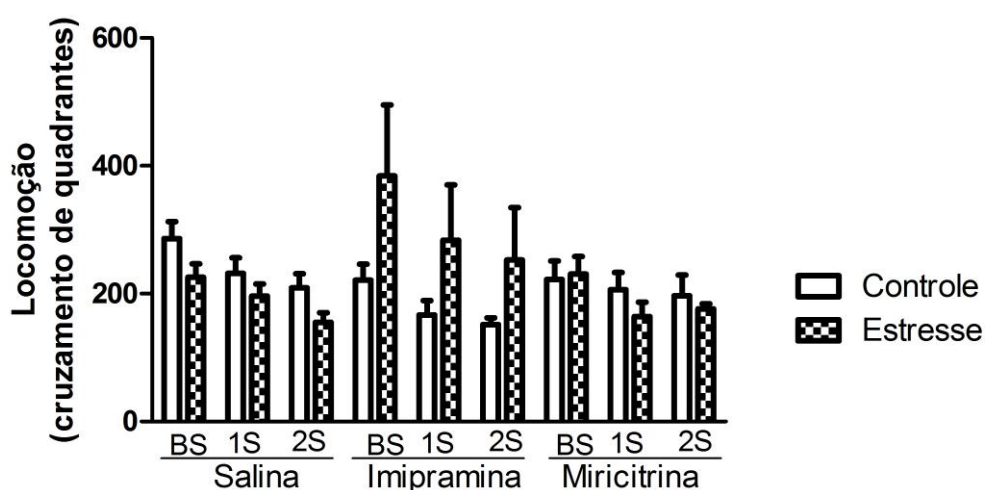


Fig.15: Avaliação da atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando e repetido no teste campo aberto, tratados com imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (20mg/kg) Dados representam % de preferência de sacarose, média+EPM. n=7-8 camundongos/grupo. Medida dada por número de quadrantes cruzados. (BS: basal; 1S: primeira semana de tratamento; 2S: segunda semana de tratamento)

### 7.1.3 Teste de nado forçado

Após a indução da anedonia, mais especificamente, a partir da quinta semana de estresse brando, os camundongos foram submetidos a um teste basal de nado forçado. Neste teste o tempo de imobilidade dos animais foi tomado como medida de comportamento tipo depressivo. Os animais utilizados neste teste são os

mesmos em que foi observada a reversão da anedonia induzida por estresse brando com o tratamento com imipramina (controle positivo) e miricitrina (droga teste). No teste do nado forçado observou-se que a imipramina, assim como a miricitrina, foram efetivas em reverter o aumento no tempo de imobilidade dos animais estressados ao final da primeira e da segunda semanas de tratamento. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,29}=34,32$ ;  $p<0.001$ ); fator tempo ( $F_{2,58}=9,21$ ;  $p<0.001$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{10,58}=7,46$ ;  $p<0.001$ ) (Fig.16).

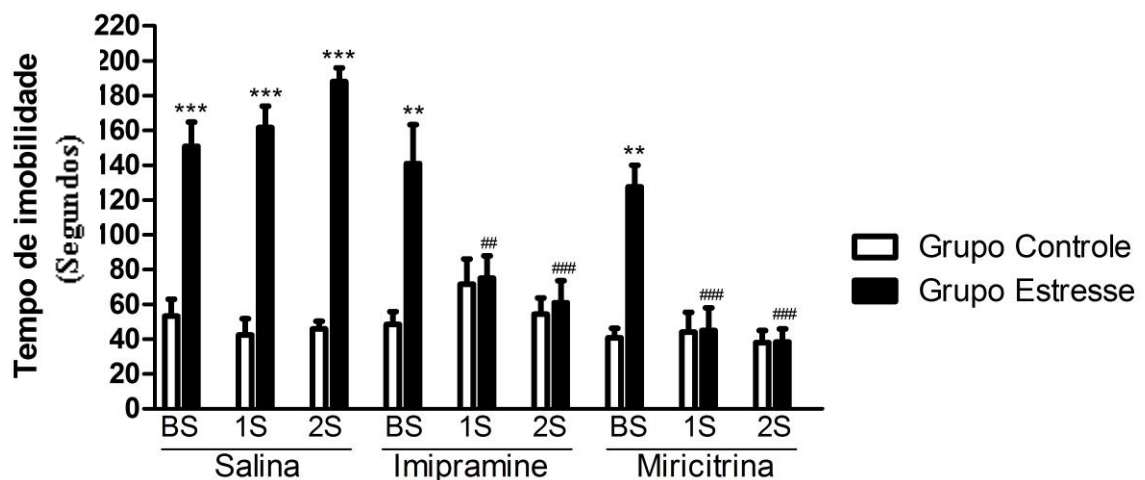


Fig.16: Avaliação do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos submetidos a estresse brando repetido antes e após o tratamento por 14 dias com imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg) (IP).  $n=7-8$  camundongos/ grupo. \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0.001$ -comparado ao grupo controle; ## $p<0,01$  e ### $p<0.001$  - comparado ao grupo estresse tratado com salina. BS: basal; 1S: primeira semana de tratamento; 2S: segunda semana de tratamento.

#### 7.1.4 Teste de suspensão pela cauda

Em um grupo diferente de camundongos foi realizada uma nova indução de anedonia por estresse brando, com mensuração realizada por teste de preferência de sacarose. Após a indução da anedonia (dados não mostrados), os animais foram submetidos a um teste basal de suspensão pela cauda. O tempo de imobilidade foi significativamente maior no grupo com anedonia (estressado) quando comparado ao grupo controle. Posteriormente estes animais foram tratados pelo mesmo período de 14 dias com a imipramina (20mg/kg), miricitrina (10mg/kg) ou salina e reexpostos ao mesmo teste. Os dados obtidos demonstraram que tanto a imipramina quanto a miricitrina foram efetivas em reverter o comportamento anedônico no teste de

suspensão pela cauda. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,36}=62,07$ ;  $p<0.001$ ); fator tempo ( $F_{1,36}=37,61$ ;  $p<0.001$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{5,36}=14,99$ ;  $p<0.001$ ) (Fig.17).

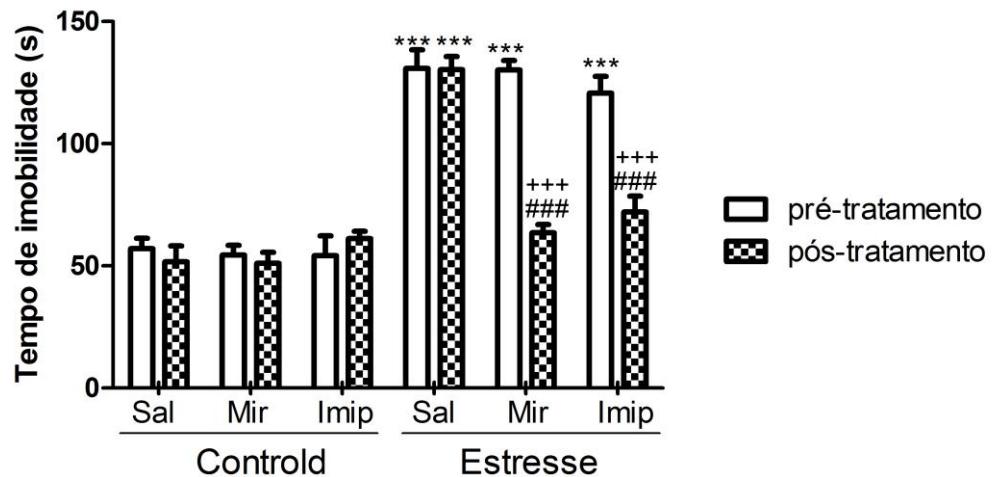


Fig.17: Avaliação do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando e repetido antes e após o tratamento por 14 dias com imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg)  $n=7-8$  camundongos/ grupo. Dados representam média+EPM do tempo de imobilidade (seg).  $n=7-8$  camundongos/grupo \*\*\* $p<0.001$ -comparado ao grupo controle; ### $p<0.001$  - comparado ao pré-tratamento; \*\*\* $p<0.001$  - comparado ao grupo estresse tratado com salina.

#### 7.1.5 Peso relativo da glândula adrenal de camundongos submetidos a estresse brando e repetido

Após o teste de suspensão pela cauda, os animais foram sacrificados e suas glândulas adrenais retiradas para mensuração de seu peso. O aumento do tamanho da glândula está relacionado à exposição a longos períodos de estresse e hiperatividade do eixo HPA. De acordo com o esperado, foi observada uma diferença significativa entre diferentes tratamentos dentro do grupo estresse, ou seja, o grupo estresse salina apresentou um aumento do peso relativo da glândula em relação ao grupo não estressado tratado com salina e o tratamento com imipramina e miricitrina foram eficazes em reverter tal parâmetro. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,36}=14,81$ ;  $p<0.001$ ) (Fig.18).

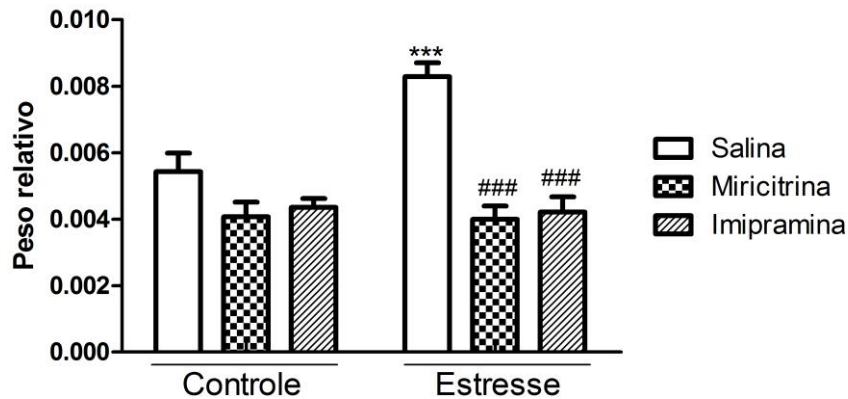


Fig.18: Peso relativo da adrenal (proporção do peso em relação ao peso do corpo) de camundongos com anedonia induzida por estresse brando repetido tratados por 14 dias com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg) (IP). Dados representam média+EPM n=7-8 (\*\*p<0.001-comparado ao controle salina; ###p<0.001 - comparado ao grupo estresse tratado com salina).

## 7.2 Ensaios neuroquímicos

### *7.2.1 Dosagens de monoaminas no estriado de camundongos submetidos a estresse brando e repetido*

Após os testes comportamentais de nado forçado, os animais foram sacrificados e seus cérebros dissecados para a retirada do estriado para dosagem de monoaminas. Os resultados obtidos mostraram a eficácia da miricitrina e uma tendência da imipramina em aumentar os níveis de serotonina e dopamina no estriado dos animais. Não houve diferença significativa entre o grupo salina controle e estresse, porém houve uma pequena diminuição nos níveis de monoaminas no grupo estresse quando comparado ao controle. Não houve alteração nos níveis de noradrenalina, quando comparados ao grupo estresse tratado com salina. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento [serotonina ( $F_{5,30}=4,08$ ;  $p<0.01$ ); dopamina ( $F_{5,36}=12,39$ ;  $p<0.001$ ); noradrenalina ( $F_{5,36}=0,98$ ;  $p<0.44$ )]. (Fig.19A, B e C).

### *7.2.2 Análise da alteração os níveis em IL-6 e TNF- $\alpha$ no hipocampo de camundongos submetidos a estresse brando e repetido*

O material utilizado para realização deste experimento foi o hipocampo dos animais nos quais foi realizado o teste de nado forçado e campo aberto após a indução da anedonia. Pode-se observar que ambas as drogas utilizadas foram

efetivas em reverter o aumento dos níveis de interleucina (IL-6) causado pelo estresse. Por outro lado, não se observou alteração nos níveis de TNF- $\alpha$ . As análises foram realizadas utilizando ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey: TNF- $\alpha$  [ $F_{5,31}=0,71$ ;  $p<0,620$ ] e IL-6 [ $F_{5,33}=7,58$ ;  $p<0,001$ ] respectivamente (Fig.20A e B).

### 7.2.3 *Análise da estresse oxidativo (GSH e LPO) no SNC de camundongos submetidos a estresse brando e repetido*

Os mesmos animais dos quais tiveram suas adrenais pesadas tiveram seus cérebros dissecados para medição de diferentes parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados obtidos mostraram diferença estatisticamente significativa para os marcadores não enzimáticos no cérebro, GSH e LPO. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey: GSH ( $F_{5,35}=5,21$ ;  $p<0,001$ ) e LPO ( $F_{5,35}=9,37$ ;  $p<0,001$ ), respectivamente. (Fig.21A e B).

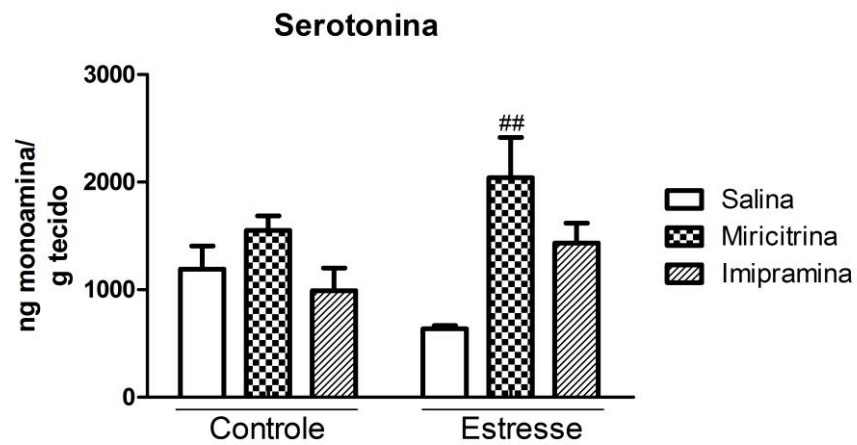
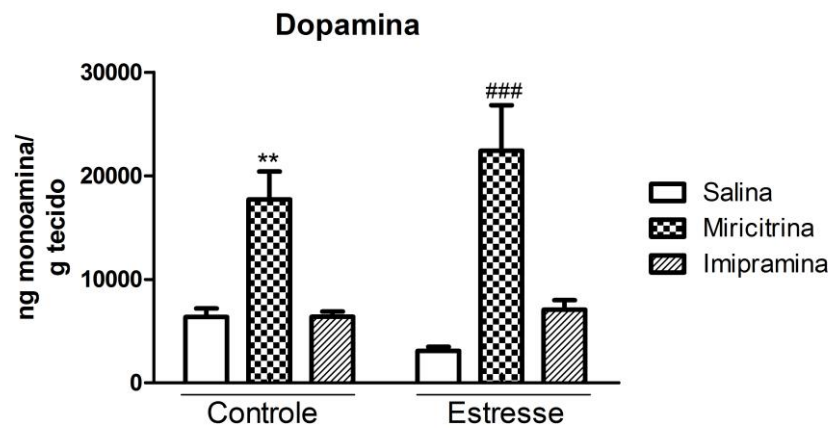
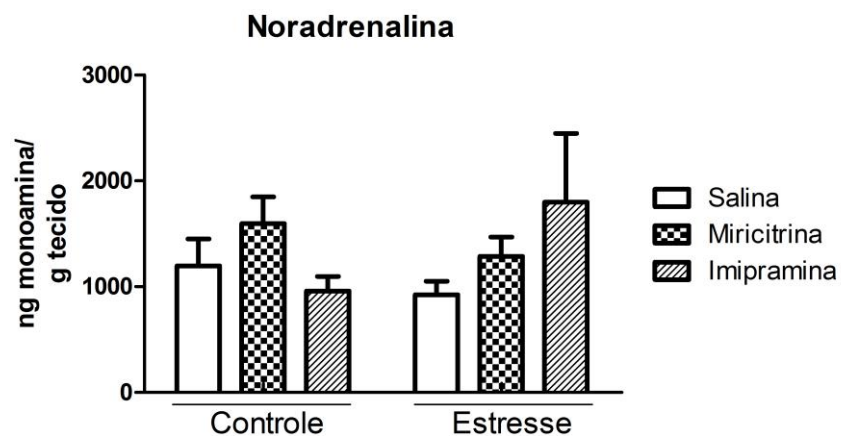
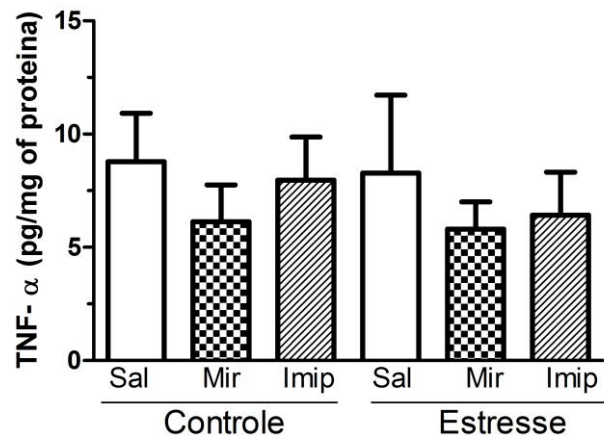
**A****B****C**

Fig.19: Quantificação dos níveis de serotonina (A), dopamina (B) e noradrenalina (C) no estriado de animais submetidos ao estresse brando e repetido e seus controles, após o tratamento por 14 dias com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg) (IP) n=5-7 camundongos/grupo \*\*p<0.001-comparado ao controle salina; ##p<0.01; ###p<0.001 - comparado ao grupo estresse tratado com salina.

A



B

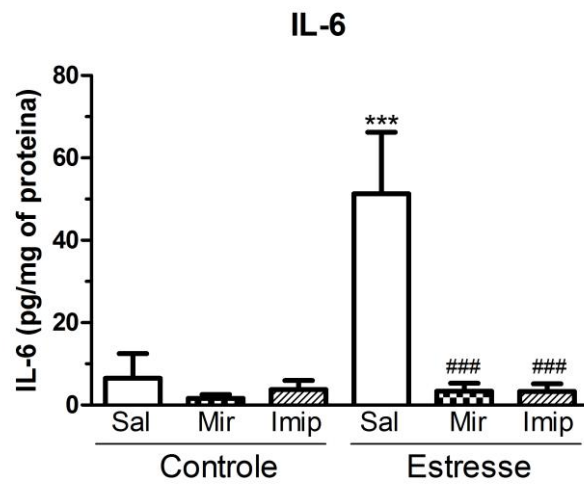
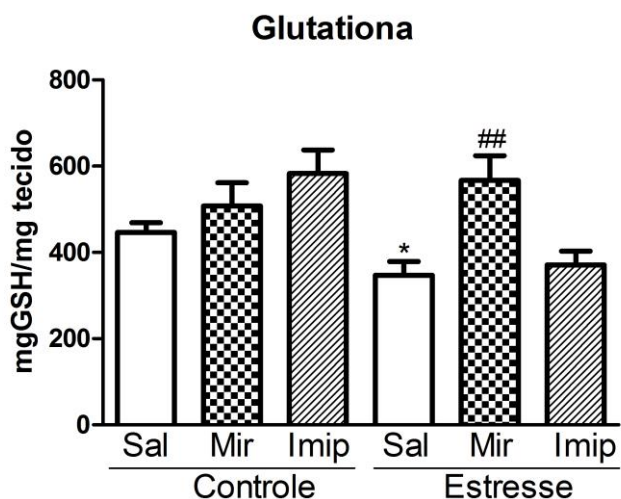


Fig. 20: Concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 em hipocampus de camundongos com anedonia induzida por estresse brando e repetido e controles após o tratamento por 14 dias com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg) (IP) n=7 camundongos/grupo \*\*\*p<0.001-comparado ao controle salina; ###p<0.001 - comparado ao grupo estresse tratado com salina.

A



B

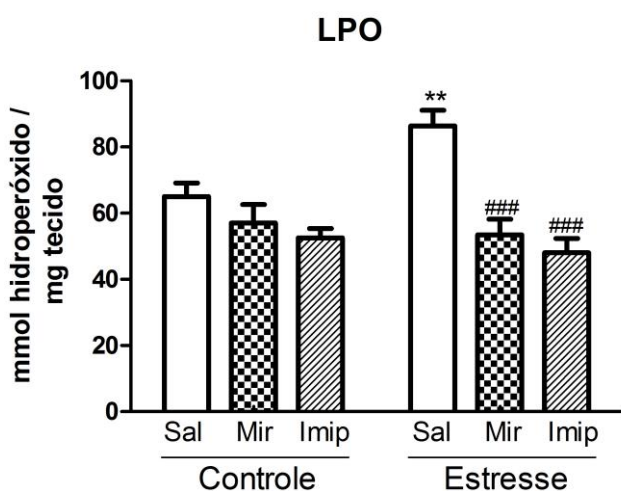


Fig. 21: GSH e LPO em cérebros de camundongos com anedonia induzida por estresse brando e repetido e controle após o tratamento com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg) por 14 dias. n=6-7 camundongos/grupo. \*p<0.05 e \*\*p<0.01- comparado ao controle salina; ##p<0.01 e ###p<0.001 - comparado ao grupo estresse tratado com salina.

## 8 Discussão

Como já mencionado anteriormente, o estudo pré-clínico do THB é feito normalmente se avaliando os estados depressivo e maníaco de maneira separada, uma vez que não existe modelo validado de TBH, ou seja, que mimetize o estado depressivo e maníaco no mesmo animal. Portanto, nesta discussão será avaliado o efeito da miricitrina em modelos de mania e depressão separadamente. Nossos resultados mostraram que ela apresenta efeito em modelos de ambos estados do TBH, portanto na conclusão geral, será apresentada um resumo geral dos dados



obtidos e por conseguinte a possibilidade de utilização da droga para o tratamento do THB como um estabilizador de humor.

## 8.1 Mania

O presente estudo replicou estudos anteriores que mostraram que as drogas com atividade antimaníaca são eficazes na reversão da hiperlocomoção causada pela anfetamina e pela privação de sono. Além disto, pela primeira vez, observou-se que drogas antimaníacas também revertem o aumento no número de vocalizações ultrassônicas de alta frequência causado pela anfetamina. De acordo com nossos resultados, a resposta de animais para o tratamento é aparentemente mais visível quando analisamos os efeitos da vocalização ultrasônica (USV) do que na atividade locomotora. Além disso, outro fármaco que pode ser um novo alvo para a pesquisa de drogas com atividade antimaníaca, a miricitrina, foi eficaz nos testes empregados, assim como foram o tamoxifeno e o lítio. A utilização de lítio e tamoxifeno foram baseadas em estudos da reversão da hiperlocomoção por anfetamina e corroboram os nossos dados, mostrando a validade nos testes utilizados (Manji e Lenox, 1999; Hahn *et al.* 2005; Zarate *et al.* 2007; Yildiz *et al.* 2008; Amrollahi, *et al.* 2011).

Entre os modelos utilizados, a hiperlocomoção induzida por psicoestimulante é o modelo de mania mais empregado. Neste estudo, os fármacos utilizados se mostraram eficazes na reversão da locomoção total de animais em ambos os protocolos (privação de sono e indução por anfetamina). Estudos em animais demonstraram a eficácia dos estabilizadores de humor, como o lítio e ácido valpróico na inibição da hiperlocomoção induzida por anfetamina (Einat *et al.* 2007; O'Donnell e Gould, 2007; Sabione *et al.* 2008) e por privação de sono (Gessa *et al.* 1995); alguns estudos (p.e. Sabione *et al.*, 2008) demonstraram a eficácia do tamoxifeno em reverter o mesmo comportamento. Além disso, estudos clínicos têm demonstrado a eficácia de ambos os medicamentos (lítio e valproato) em reverter comportamento maníaco em pacientes (Hahn *et al.* 2005; O'Donnell e Gould, 2007; Zarate *et al.* 2007; Yildiz *et al.* 2008). Estes resultados corroboram a sensibilidade do modelo em nossas condições experimentais. A miricitrina, também foi eficaz em reverter este comportamento, conforme hipótese inicial, uma vez que esta substância tem atividade inibitória sobre a PKC (Meotti *et al.* 2006; Fernandez *et al.* 2007; Pereira *et al.* 2011) e postula-se que a eficácia dos estabilizadores do humor

é, pelo menos em parte, relacionada à sua capacidade de inibir a PKC (DiazGranato e Zarate, 2008). Outro parâmetro analisado no teste de privação de sono é a latência de sono, que tem sido relacionada com a insônia frequentemente observada em pacientes bipolares em fase maníaca. Estudos reportam que os animais privados de sono apresentam uma latência maior para dormir após serem colocados novamente em uma caixa viveiro e que drogas com atividade antimaníaca, como o lítio, revertem tal parâmetro (Gessa *et al.* 1995). Neste sentido, a miricitrina, de modo similar ao lítio, reduziu a latência para o sono, enquanto o tamoxifeno não. Este resultado indica que pode existir diferenças no mecanismo de ação antimaníaca destas drogas.

Em relação à vocalização ultrasônica (USV), como citado anteriormente, este é o primeiro estudo que tenta correlacionar o número de vocalizações ultrassônicas e comportamento tipo maníaco em animais. Este aumento da vocalização poderia ser relacionado com a taquilalia presente nos pacientes na fase maníaca. Os dados obtidos mostraram que os fármacos antimaníacos utilizados foram eficazes em bloquear o aumento no total de vocalização de alta frequência causado pela anfetamina. Uma vez que o aumento da vocalização causada pela anfetamina estaria relacionado com o sistema dopaminérgico e inibidores da PKC parecem inibir a hiperativação deste sistema, era previsto encontrar tais resultados (Wintink e Brudzynski, 2001; Burgdorf *et al.* 2001; Burgdorf *et al.* 2007; Ahrens *et al.* 2009; Natusch e Schwarting, 2010). De acordo com os trabalhos de Burgdorf e colaboradores (2007), a microinjeção de anfetamina no núcleo accumbens de roedores estimularia a atividade dopaminérgica da área, podendo ser tomado como um estímulo apetitivo para o animal, e este estímulo provocaria um aumento na emissão de vocalizações de alta frequência (50 kHz). Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de Natusch e Schwarting (2010), no qual a administração de anfetamina sistêmica, como no nosso trabalho, levou a um aumento da vocalização de alta frequência. Em nosso estudo, a primeira preocupação foi definir a dose de lítio a ser utilizada, uma vez que a anfetamina induz um aumento de vocalização de alta frequência (50kHz - que é relacionada a estímulo apetitivo) e que alguns estudos reportaram que o lítio induziria um aumento de vocalizações de baixa frequência (22 kHz - que é relacionada a estímulo aversivo). Assim sendo, um poderia inibir a ocorrência do outro e proporcionar um resultado errôneo. As doses

de 50mg/kg (Cappeliez e White, 1981; Frey *et al.* 2006) e 100 mg/kg (Tomasiewicz *et al.* 2006) apresentaram eficácia em reverter a hiperlocação induzida por anfetamina, existindo, porém, trabalhos que relatam que doses de 10-30 mg/kg poderiam induzir a vocalização de baixa frequência. O trabalho de Tomasiewicz e colaboradores (2006) mostrou que a dose de 100 mg/kg foi apenas parcialmente eficaz na redução da locomoção provocada pela anfetamina em ratos, sendo que a dose eficaz neste trabalho foi de 300 mg/kg. Entretanto, esta dose causou efeitos colaterais nos ratos, tais como poliúria, diarreia e baixa frequência de comportamento de limpeza. Portanto nós escolhemos inicialmente a dose de 100 mg/kg. Por outro lado, como citado acima, estudos têm demonstrado que a administração de lítio, tanto aguda como cronicamente, em concentrações entre 10-30 mg/kg foi capaz de induzir um comportamento aversivo em ratos. O primeiro estudo a mostrar isso foi o Shippenberg e colaboradores (1988), em que eles observaram que a administração aguda de 40 mg/kg de lítio levaria a um comportamento tipo aversivo e este comportamento poderia estar relacionado com a atividade opióide. Mais tarde, Burgdorf e colaboradores (2001) demonstraram que o tratamento com lítio, durante 3 dias, em doses de 10-30 mg/kg levou a um aumento do número de vocalizações de baixa frequência, que são características de comportamento aversivo de roedores. Entretanto, nossos resultados não replicaram os dados desses pesquisadores, uma vez que os animais em nossos experimentos não mostram uma emissão significativa de vocalizações de baixa frequência.

A utilização de tamoxifeno nos testes foi realizada para estudar se a reversão do efeito da anfetamina na vocalização pelo lítio seria um efeito exibido também por outras drogas antimaníacas e pela sua ação relativamente seletiva na inibição da PKC, uma vez que o ácido valpróico apresenta múltiplos efeitos neuroquímicos. Portanto, o tamoxifeno é uma droga útil não só para a validação preditiva do modelo, mas também para estudo do papel da PKC. Neste sentido, uma vez que todas as drogas utilizadas apresentam como mecanismo de ação comum a inibição da PKC (especialmente os subtipos  $\alpha$  e  $\epsilon$ ), os resultados corroboram a hipótese de que a PKC apresenta influência em alguns dos comportamentos comuns em pacientes maníacos (Wang e Friedman, 1996; Giambalvo, 2004; Hahn *et al.* 2005; Einat *et al.* 2007; Zarate e Manji, 2007; Chen *et al.* 2009). Estudos têm demonstrado que as substâncias, tais como forbol 12-miristato 13-acetato (PMA),

que são ativadores de PKC, levam a uma diminuição da disponibilidade do transportador de dopamina (DAT) (Foster *et al.* 2003; Cervinski *et al.* 2005), acarretando a permanência da dopamina por um longo período de tempo na fenda sináptica. Por sua vez, os estudos de Boudanova e colaboradores (2008) e Fleckenstein e colaboradores (2007) mostraram que a anfetamina também tem a capacidade de reduzir a disponibilidade de DAT e que esta atividade é independente da PKC. Por outro lado, no estudo de Johnson e colaboradores (2005), a atividade da PKC é importante para a liberação de dopamina causada pela anfetamina e ainda mais, que a anfetamina pode ativar PKC (Gnagy *et al.* 1993; Fleckenstein *et al.* 2007; DiazGranados e Zarate, 2008). Portanto, estes dados reforçam a ideia de que ao se inibir a PKC, seria possível inativar o efeito da anfetamina, levando a uma diminuição da ativação do sistema dopaminérgico e, conseqüentemente, reduzindo a hiperlocomoção e as vocalizações. Vários estudos mostraram que as drogas que inibem a atividade da PKC apresentam um efeito antimaníaco e acredita-se que esta atividade está relacionada com a maior disponibilidade de DAT (Kantor e Gnagy, 1997; DiazGranados e Zarate, 2008.). A ação de lítio sobre PKC estaria relacionada com uma diminuição da disponibilidade de fosfatidil inositol (PI), que é essencial para a ativação da PKC (Manji *et al.* 1995; Brunello, 2004). O tamoxifeno também é um inibidor da PKC, que além de inibi-la diretamente também atuaria inibindo a fosforilação da GAP-43 (que é substrato da PKC) pela anfetamina (Einat *et al.* 2007; Zarate *et al.* 2009). Finalmente, em relação ao miricitrina, o mecanismo de ação pelo qual ocorre uma inibição da PKC não foi elucidado, mas de acordo com o trabalho de Meotti e colegas (2006), esta ação pode estar relacionada com a inibição da ativação da PKC, baseado no mecanismo de ação já observado em outros flavonóides com ação inibitória na PKC.

Por último, de acordo com os nossos resultados, a indução de hiperlocomoção por privação de sono levou a um aumento nos níveis de estresse oxidativo, aqui mensurado somente pelo teste de peroxidação lipídica. A razão da escolha de um único teste foi a carência de material biológico e o uso de uma técnica sensível para o tecido escolhido, pois, como já mencionado anteriormente, em tecido cerebral é mais efetiva a utilização de técnicas de análise que não envolvam atividade enzimática (GSH ou então peroxidação lipídica). Nossos dados corroboram os achados de Frey e colaboradores (2006) nos quais o lítio não foi

efetivo em reverter os níveis de peroxidação lipídica hipocampal após a exposição a um fator desencadeante de mania, que no trabalho de Frey foi administração de anfetamina e no nosso a privação de sono. Por outro lado, em relação ao tamoxifeno e a miricitrina, não existem trabalhos prévios analisando tal parâmetro e nossos dados mostraram que ambos foram efetivos em reverter o aumento da peroxidação lipídica causada pelo modelo de privação de sono. É importante salientar que estudos têm sugerido que ocorre um aumento da peroxidação lipídica no soro de pacientes bipolares (Kuloglu *et al.* 2002; Ranjekar *et al.* 2003; Andreazza *et al.* 2007a), além de dano no DNA destes pacientes (Buttner *et al.* 2007) e alterações nos níveis de outras enzimas antioxidantes (Ozcan *et al.* 2004; Kuloglu *et al.* 2002). Considerando que o estresse oxidativo apresenta seus maiores níveis durante a fase maníaca do THB (Andreazza *et al.* 2007a), fármacos que além de apresentarem efeito antimaníaco conseguem reverter os níveis de estresse oxidativo, são interessantes alvos terapêuticos.

Em resumo, agudamente a miricitrina se mostrou efetiva em reverter os parâmetros comportamentais e o estresse oxidativo, se mostrando então um potencial fármaco para o tratamento da mania.

## **8.2 Depressão**

Os nossos dados mostraram que ambas as drogas testadas, imipramina (empregada como controle positivo) e miricitrina foram efetivas em reverter o comportamento tipo depressivo induzido nos animais e avaliado pelos testes de preferência de sacarose, nado forçado e suspensão pela cauda. A partir dos dados obtidos foi possível observar a validade do modelo empregado em nosso laboratório (efeitos da imipramina), bem como o potencial efeito tipo antidepressivo da miricitrina.

Nesta etapa, o primeiro passo foi a determinação da concentração ideal de sacarose, uma vez que a preferência por sacarose nos animais parece ter uma função que se apresenta como curva em U invertida, ou seja, existe uma concentração ideal, onde a maior parte dos animais apresentará um maior consumo de sacarose que água, porém após isto, com a exposição a concentrações crescentes de sacarose, este consumo tende a cair (Monleon *et al.* 1995). Além disto, procuramos determinar a concentração limiar para evitar que um valor

hedônico elevado diminuísse o efeito deletério dos estresses repetidos. Em nosso trabalho a concentração ideal foi a de 1% de sacarose.

O modelo de estresse crônico para indução de anedonia apresenta boa validade preditiva, de face e de constructo (Willner 1997; Paykel, 2001; Kubera *et al.* 2001; Joels *et al.* 2004), sendo que este modelo é amplamente utilizado e aceito como indutor de comportamento tipo depressivo em animais. Ao se utilizar tal protocolo, parâmetros como aumento dos níveis de corticosterona, diminuição dos níveis de BDNF e aumento de citocinas pró-inflamatórias são observados, bem como a anedonia, o que mimetiza alguns dos sinais e sintomas observados em pacientes em depressão (Duman *et al.* 2000; Kubera *et al.* 2004; Mössner *et al.* 2007). Além disso, um fator interessante sobre o modelo é que a demora de semanas para a indução da anedonia, bem como a necessidade de tratamento repetido para sua reversão, o que mimetiza a cronologia da doença, uma vez que esta não se desenvolve rapidamente e que o tratamento demora semanas para começar a apresentar efeitos clínicos (Willner, 1997). Nossos dados demonstraram que após cinco semanas de exposição a diferentes estressores os animais apresentaram comportamento tipo anedônico quando comparados ao grupo controle. Nosso período da indução da anedonia foi mais longo que o período utilizado no protocolo original criado por Willner e colaboradores (1997), onde apenas duas semanas foram efetivas em induzir a anedonia. Entretanto, no presente estudo utilizamos camundongos e não ratos e a seqüência de estressores foi um pouco modificada em relação à seqüência original. A redução do consumo de solução de sacarose após 2 semanas de estresse também foi observada por Ma e colaboradores (2011) e Azpiroz e colaboradores (1999). Neste último a reversão da anedonia também foi feita com imipramina. De qualquer modo, nosso protocolo foi efetivo em induzir a anedonia, como esperado, além do que outros estudos relatam tempos diferentes (até nove semanas) de exposição aos estressores para indução da anedonia. Estes resultados indicam que o tempo necessário irá depender da linhagem de animais em questão (Papp *et al.* 2003; Li *et al.* 2009; Schweizer *et al.* 2009), além de outros fatores como, por exemplo, o parâmetro da anedonia considerado (consumo ou preferência por solução de sacarose). A droga padrão utilizada para a reversão da anedonia foi a imipramina. Trabalhos relatam que a imipramina na dose de 20 mg/kg foi efetiva em reverter a anedonia causada por

estresse, como no estudo de Monleon e colaboradores (1995). Interessante notar que Kumar e colaboradores (2009) reportam o envolvimento do sistema nitrinérgico nos efeitos da imipramina, pois a administração prévia de L-arginina reverteu os efeitos da imipramina em testes de ansiedade, indicando a mediação nitrinérgica em alguns efeitos da imipramina. Meotti e colaboradores (2006) mostram que também a miricitrina apresenta efeito sobre o sistema nitrinérgico, pois seu efeito antinociceptivo é atenuado pela administração prévia de L-arginina. O teste de campo aberto foi realizado para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a atividade motora e observou-se que nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora, conforme reportado previamente nos trabalhos de Monleon e colaboradores (1995) para a imipramina e Pereira e colaboradores (2011) para a miricitrina.

Outro teste realizado foi o teste do nado forçado, que é um dos testes mais antigos e o mais utilizado para estudo de drogas com potencial antidepressivo. Este teste apresenta boa validade preditiva e boa replicabilidade (Porsolt *et al.* 1978; Borsini e Meli, 1988; Petit-Demouliere *et al.* 2005) e sua premissa é a de que em uma situação de estresse inescapável ratos e camundongos adquirem uma postura de imobilidade, que é reduzida por drogas antidepressivas. Neste teste, animais apresentam primeiramente uma movimentação intensa na tentativa de fugir do cilindro com água, porém, após este período inicial, eles param de nadar ou tentar escalar as paredes e começam a realizar somente os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. Vários estudos mostram que fármacos antidepressivos aumentam este período de atividade dos animais e, conseqüentemente, diminuem a imobilidade (Borsini e Meli, 1988; Petit-Demouliere *et al.* 2005). Nossos animais foram expostos a três baterias de teste de nado forçado, a primeira para avaliar seu tempo de imobilidade inicial, ou seja, após a indução da anedonia, e as duas outras baterias após tratamento (7 e 14 dias de tratamento respectivamente). De acordo com o trabalho de Mezdari e colaboradores (2011) a re-exposição ao teste de nado forçado poderia levar a uma habituação com conseqüente aumento do tempo de imobilidade, o que, porém, não foi observado no presente estudo, havendo apenas uma tendência no grupo não tratado.

Estudos com animais submetidos ao protocolo de estresse crônico reportam hipertrofia da glândula adrenal (p.ex. Reul *et al.* 1993). Além disto, de acordo com Price e colaboradores (2002), a resposta dos animais ao estresse de exposições

repetidas ao nado forçado é dependente de serotonina e esta é modulada pelos níveis de CRF. Assim sendo, quando ocorre a re-exposição do animal ao teste, ocorre diminuição da serotonina disponível na fenda sináptica graças à modulação pelo CRF, que está aumentado, levando à imobilidade. A inibição de CRF restabelece os níveis de serotonina e diminui a imobilidade do animal em exposições repetidas ao teste de nado forçado. Portanto, um aumento do tamanho da adrenal após estresse repetido poderia ser tomado como indicativo da hiperatividade do eixo HPA. Nossos dados mostraram uma hipertrofia da glândula adrenal nos animais estressados, que foi revertida após o tratamento com imipramina e miricitrina, indicando uma reversão dos efeitos do estresse repetido no eixo HPA e um perfil similar da imipramina (antidepressivo padrão) e da miricitrina.

O tratamento com miricitrina foi capaz de aumentar os níveis de serotonina no estriado dos animais, enquanto o aumento de serotonina pela imipramina não foi significativo, provavelmente devido a grande variabilidade e ao pequeno número de amostras deste grupo (n=3). Estudos reportam que o aumento dos níveis de serotonina teria função antidepressiva (p.ex. como o de Abdel-Salam *et al.* 2003). Estes dados são coerentes com a proposta da relação inversa entre eixo HPA e serotonina (Price *et al.* 2002), Tem sido observada uma hiperatividade do sistema nitrinérgico em pacientes depressivos e a diminuição desta atividade apresentaria efeito antidepressivo (Harkin *et al.* 2004; Joca e Guimarães, 2006). Nesta linha, estudos relatam que o óxido nítrico pode levar a uma inativação da serotonina bem como de sua enzima de síntese (Kuhn e Arthur, 1996; Fossier *et al.* 1999) e este poderia ser o mecanismo pelo qual a miricitrina estaria levando a um aumento da atividade serotoninérgica. Acredita-se também que, ao menos em parte, o efeito de alguns antidepressivos, como a imipramina, por exemplo, se deva a uma atividade inibitória no sistema nitrinérgico (Hashioka *et al.* 2007; Krass *et al.* 2011).

Em relação à dopamina, somente a miricitrina levou a um aumento de seus níveis, sendo este aumento visível tanto nos animais do grupo controle quanto do grupo estressado. De acordo com Dunlop e Nemeroff (2007) ocorreria uma diminuição da atividade dopaminérgica em pacientes depressivos e o seu restabelecimento estaria relacionado a um possível efeito antidepressivo. Nestler e Carlezon (2006) sugerem que essa diminuição dopaminérgica no sistema



mesolímbico estaria relacionada à perda do comportamento hedônico, desencadeando então o comportamento anedônico nos animais.

Finalmente, em relação à noradrenalina, não foram observadas diferenças significantes entre os tratamentos, embora haja uma tendência de aumento pelo tratamento com a imipramina.

Outro teste realizado foi o teste de suspensão pela cauda, que, assim como o teste de nado forçado, apresenta boa validade preditiva (Cryan *et al.* 2002). Estudos têm relatado que fármacos antidepressivos como a imipramina são efetivos em diminuir o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, sendo que um maior tempo de imobilidade é tomado como comportamento depressivo (Ripoll *et al.* 2003; Varty *et al.* 2003). Em nosso protocolo experimental os testes de natação forçada e suspensão pela cauda foram realizados após a indução do anedonia, antes e após o tratamento farmacológico, para observar o comportamento de imobilidade do animal em fase anedônica e verificar sua sensibilidade aos tratamentos. A imipramina foi efetiva em reverter a imobilidade em ambos os testes, no nado forçado e na suspensão pela cauda. A miricitrina também foi efetiva em reverter a imobilidade tanto no teste de nado forçado quanto no teste de suspensão pela cauda, sem alterar a atividade motora espontânea, indicando assim um efeito tipo antidepressivo, apresentando, portanto, interessante potencial para o desenvolvimento de drogas com atividade antidepressiva.

Os níveis de interleucina 6 e TNF- $\alpha$  no hipocampo desses animais também foram analisados. Nossos resultados mostraram que tanto a imipramina quanto a miricitrina foram eficazes em reverter o aumento dos níveis de IL-6 causados pelo estresse brando e repetido e que os níveis de TNF- $\alpha$  não apresentaram alteração significativa. Como já mencionado, Kubera e colaboradores (2004) relatam que o aumento dos níveis de IL-6 seria proporcional à severidade dos sintomas de depressão. Nesta linha, Monje e colaboradores (2011) observaram aumento de citocinas após indução de anedonia nos animais. Assim sendo existem estudos que suportam nossos dados de que a indução de anedonia esta associada a um aumento dos níveis de interleucinas que pode ser revertido pelo tratamento com antidepressivos.

Por último, em relação ao estresse oxidativo, este parece estar aumentado em decorrência da ativação do sistema imune pelo eixo HPA, sendo que vários

estudos já reportam tal aumento (Brooke e McLaughlin, 2002; Kumar *et al.* 2009; Ghadrdoost *et al.* 2011). No presente estudo observamos que a imipramina e a miricitrina foram efetivas na reversão do aumento dos níveis do estresse oxidativo demonstrado pela diminuição dos níveis de atividade do sistema antioxidante. Uma vez que a presença de enzimas antioxidantes no cérebro é baixa e são necessárias técnicas muito sensíveis para realmente dosar tais enzimas nesta área, a chance de erro caso a técnica não seja sensível é grande; por outro lado, análise dos marcadores não enzimáticos como peroxidação lipídica e GSH (glutathiona) é de fácil realização e apresenta um bom resultado, sendo então as técnicas escolhidas para o presente trabalho.

Em resumo, tanto a miricitrina como a imipramina foram efetivas em reverter o comportamento depressivo analisado em diferentes testes comportamentais, bem como nos parâmetros neuroquímicos analisados. Assim sendo, nossos dados suportam a idéia de que a miricitrina é um bom alvo de estudo para a produção de um novo fármaco com atividade antidepressiva, assim como se mostrou para a mania.

Entretanto, neste estudo não avaliamos a toxicidade (aguda ou crônica) da miricitrina, aspecto fundamental para propor testes clínicos com este fármaco. Portanto, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a segurança da miricitrina.

### **8.3 Conclusão**

O presente trabalho mostrou que a miricitrina apresentou tanto efeito antimaníaco quanto antidepressivo. A miricitrina foi efetiva em reverter alterações comportamentais e neuroquímicos nos testes de mania empregados (hiperlocomoção induzida por anfetamina e por privação de sono em camundongos, latência de sono induzida por privação de sono em camundongos, aumento no número de vocalizações de alta-frequência induzidas por anfetamina em ratos, aumento da peroxidação lipídica em decorrência da privação de sono), de modo similar aos controles positivos (lítio e tamoxifeno). A miricitrina também foi efetiva em reverter os parâmetros comportamentais e neuroquímicos observados nos testes de depressão (comportamento anedônico induzido por estresse brando e repetido,

aumento da imobilidade nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado, hipertrofia da adrenal, alterações nos níveis de monoaminas, aumento dos níveis de interleucina 6 e aumento do estresse oxidativo – GSH e LPO), também de modo similar ao controle positivo, a imipramina.

Em relação aos pacientes bipolares, pode-se dizer que algumas características do comportamento visíveis em tais pacientes em fase maníaca seriam a taquialia, hiperatividade e diminuição da necessidade de sono, entre outros. Ainda mais, seria possível dizer que possíveis marcadores neuroquímicos seriam aumento da atividade da PKC e do estresse oxidativo. Uma droga que vem se mostrando efetiva no tratamento da fase maníaca do THB seria o tamoxifeno, porém estudos como o de Abrial e colaboradores (2013) reportam uma possível virada depressiva após o tratamento com tamoxifeno, assim sendo, tal droga embora efetiva no controle da mania não seria a melhor opção para o tratamento do THB. Por sua vez, o lítio e o valproato não são efetivos em 100% dos pacientes e apresentam efeitos colaterais, o que muitas vezes é o motivo do abandono do tratamento (Stahl, 2002). Assim sendo, a miricitrina se mostra, a partir dos nossos dados, uma boa candidata a fármaco para o tratamento da mania, não apresentando aparente efeito colateral de virada depressiva. Em relação à fase depressiva por sua vez, alguns dos marcadores são exatamente o comportamento anedônico (perda do prazer em atividades antes tidas como prazerosas), o aumento dos níveis de NO, de citocinas pró-inflamatórias (como a IL-6), do estresse oxidativo e de cortisol (indiretamente mensurável por hipertrofia da adrenal) e diminuição dos níveis de monoaminas (Reul *et al.* 1993; Kubera *et al.* 2004; McArthur e Borsini, 2006; Eren *et al.* 2007; Ruhé *et al.* 2007); mais uma vez a miricitrina (assim como nosso controle positivo aqui empregado, a imipramina) foi efetiva em reverter tais parâmetros em uma bateria de testes comportamentais e análises neuroquímicas.

Assim sendo, em conjunto, os dados obtidos demonstram que nossa droga seria uma possível candidata ao desenvolvimento de fármacos com atividade estabilizadora de humor uma vez que seria efetiva em reverter comportamento tipo depressivo e tipo maníaco de forma tão eficaz quanto drogas hoje utilizadas na clínica. Uma proposta de mecanismo de ação da miricitrina seria que a sua atividade inibitória no sistema nitrinérgico levaria a uma diminuição da ativação do eixo HPA em decorrência do estresse com consequente diminuição de cortisol plasmático, o

que por sua vez levaria a uma diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentaria em consequência os níveis de monoaminas no SNC desencadeando sua atividade tipo antidepressiva. Em contrapartida, por meio de sua atividade sobre a PKC esta também levaria a um aumento dos níveis de DAT e consequente diminuição da atividade aumentada do sistema dopaminérgico durante a fase maníaca. Por último, sua atividade de *scavenger* de radicais livres estaria atuando no sistema comum às duas fases da patologia, que é o aumento dos níveis de radicais livres, diminuído estes.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM OME., NOFAL SM., EL-SHENAWY SM. Evaluation of the antiinflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. **Pharmacol Res.** 48;157-65, 2003.
- AGUILERA G., KISS A., et.al. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. **Stress.** 10;153-61, 2007.
- AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE, L., et.al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol.** 53;1649–57, 1997.
- AHRENS AM., MA ST., et.al. Repeated intravenous amphetamine exposure: Rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. **Behav Brain Res.** 197;205–9, 2009.
- AKISKAL, HS, BOURGEOIS ML, et.al. Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorder. **J. Affect Disord.** 59(1);5-30, 2000.
- AKISKAL, H.S., HANTOUCHE, E., BOURGEOIS, M. Toward a Refined Phenomenology of Mania: Combining Clinician-Assessment and Self-report in the French EPIMAN Study. **J Affect Disord.** 67;89-96, 2001.
- AMROLLAHI Z., REZAEI F., et.al. Double-blind, randomized, placebo-controlled 6-week study on the efficacy and safety of the tamoxifen adjunctive to lithium in acute bipolar mania. **J Affect Disord.** 129;327–31, 2011.
- ANAND, A., CHARNEY, D.S. Norepinephrine dysfunction in synapse in depression. **J. Clin Psychiatry.** 61;16–24, 2000.
- ANDREAZZA AC., CASSINI C., et.al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. **J. Psychiat Res.** 41(6);523–29; 2007.
- ANDREAZZA AC, KAUER-SANT'ANNA M, et.al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **J Affect Disord.** 111(2-3);135-44, 2008.
- ANDREWS, G, SLADE, T. Agoraphobia without a history of panic disorder may be part of the panic disorder syndrome. **J. Nerv Ment Dis.** 190;624–30, 2002.
- AZPIROZ A., FANO E., et.al. Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. **Psychoneuroendocrinology.** 24(3);345-61; 1999.
- BELLODI, L., BATTAGLIA, M., DIAFERIA, G. Lifetime prevalence of depression and family history of patients with panic disorder and social phobia. **Eur Psychiatry.** 8;147–52, 1993.
- BELMAKER, R.H. Medical progress: Bipolar Disorder. **New England J. Med.** 351;476-86, 2004.
- BELMAKER, R.H. Treatment of bipolar depression. **N Engl J Med.** 356(17);1771-73, 2007.
- BENCA, R.M., OBERMAYER, W.H., THISTED, R.A., GILLIN, J.C. Sleep and psychiatric disorders: a meta-analysis. **Arch Gen Psychiatry.** 49;651-8, 1992.
- BERMAN, R.M., NARASIMHAN, M., CHARNEY, D.S. Treatment-refractory depression: definitions and characteristics. **Depression and Anxiety.** 5;154-64, 1997.
- BERTON, O. E NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosc.** 7(2);137-51, 2006.
- BHAGWAGAR Z., WYLEZINSKA M., JEZZARD P. Reduction in occipital cortex gamma aminobutyric acid concentrations in medication-free recovered unipolar depressed and bipolar subjects. **Biol Psychiatry.** 61;806-12,2007.
- BHANA N., PERRY CM. Olanzapine: a review of its use in the treatment of bipolar I disorder. **CNS Drugs.** 15;871–904,2001.
- BIENVENU OJ., ONYIKE CU., STEIN MB. Agoraphobia in adults: incidence and longitudinal relationship with panic. **Br. J. Psychiatry.** 188;432–8, 2006.

- BIRT DF., HENDRICH S., WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacol Ther.** 90;157–77; 2001.
- BONHOMME N., ESPOSITO E. Involvement of serotonin and dopamine the mechanism of antidepressant drugs - review. **J. Clin. Psychopharmacol.** 18;447–54, 1998.
- BORSINI F, MELI A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacol. (Berl).** 94(2);147-60, 1988.
- BOUDANOVA E., NAVAROLI DM., MELIKIAN HE. Amphetamine-induced decreases in dopamine transporter surface expression are protein kinase C-independent. **Neuropharmacol.** 54;605-12, 2008.
- BRAMBILLA P., PEREZ J., et.al. GABAergic dysfunction in mood disorders. **Mol Psychiatry.** 8;721–37, 2003.
- BRENNAN JE., BREDT DS. Nitric oxide signaling in the nervous system. **Methods Enzymol.** 269;119-29, 1996.
- BRILL S., PENAGALURI P., et.al. Sleep disturbances in euthymic bipolar patients. **Ann Clin Psychiatry.** 23(2);113-6, 2011.
- BROOKE S., MCLAUGHLIN J., et.al. Effect of gp120 on glutathione peroxidase activity in cortical cultures and the interaction with steroid hormones. **J. Neurochem.** 81;277–84, 2002.
- BRUDZYNSKI SM., KOMADOSKI M., PIERRE JSt. Quinpirole-induced 50 kHz ultrasonic vocalization in the rat: Role of D2 and D3 dopamine receptors. **Behav Brain Res.** 226;511–8, 2011.
- BRUNELLO N. Mood stabilizers: protecting the mood. . protecting the brain. **J Affect Disord.** 79;S15–20, 2004.
- BURGDORF J, KNUTSON B., et.al. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Behav Neurosci.** 115;940–4, 2001.
- BURGDORF J., WOOD PL., et.al. Neurobiology of 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. **Behav Brain Res.** 182;274-83, 2007.
- BUTTNER N., BHATTACHARYYA S., et.al. DNA fragmentation is increased in non-GABAergic neurons in bipolar disorder but not in schizophrenia. **Schizophr Res.** 93(103);33-41, 2007.
- BYMASTER FP., FELDER CC. Role of the cholinergic muscarinic system in bipolar disorder and related mechanism of action of antipsychotic agents. **Mol. Psychiatry.** 7(1);S57–63, 2002.
- CALABRESE V., SCAPAGNINI G., et.al. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. **Neurochem Res.** 26(6);739-64, 2001.
- CAPPELIEZ P, MOORE E. Effects of lithium on an amphetamine animal model of bipolar disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 14(3);347-58, 1990.
- CERVINSKI MA., FOSTER JD., VAUGHAN RA. Psychoactive Substrates Stimulate Dopamine Transporter Phosphorylation and Down-regulation by Cocaine-sensitive and Protein Kinase C-dependent Mechanisms. **J Biol Chem.** 280(49);40442–9, 2005.
- CIPRIANI A, BARBUI C, et.al. Comparative efficacy and acceptability of antimanic drugs in acute mania: a multiple-treatments meta-analysis. **Lancet.** 378(9799);1306-15, 2011.
- CHEN L., HUANG LY. Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. **Nature.** 356;521-3. 1992.
- CHEN Y, WANG M, et.al. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging active components from *Polygonum multiflorum* thunb. **J Agric Food Chem.** 47(6);2226-8, 1999.
- CHEN G., MANJI HK., et.al. Chronic sodium valproate selectively decreases protein kinase C  $\alpha$  and  $\epsilon$  in vitro. **J Neurochem.** 63;2361-4, 1994.
- CHEN JC., CHEN PC., CHIANG YC. Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. **Chang Gung Med J.** 32;148-54, 2009a.

- CHEN R., FURMAN CA., et.al. Protein Kinase C - Is a Critical Regulator of Dopamine Transporter Trafficking and Regulates the Behavioral Response to Amphetamine in Mice. **J. Pharmacol Exp Ther.** 328(3);912–20, 2009b.
- CLARK L, IVERSEN SD, GOODWIN GM. A neuropsychological investigation of prefrontal cortex involvement in acute mania. **Am J Psychiatry.** 158;1605–11, 2001.
- COFFMAN JA., BORNSTEIN RA., et.al. Cognitive impairment and cerebral structure by MRI in bipolar disorder. **Biol Psychiatry.** 27;1188-96, 1990.
- COLOM F., VIETA E., et.al. Clinical and therapeutic implications of predominant polarity in bipolar disorder. **J. Affect Disord.** 93;13–17, 2006.
- COLOMBO C., BENEDETTI F., et.al. Rate of switch from depression into mania after therapeutic sleep deprivation in bipolar depression. **Psychiatry Res.** 86(3);267-70, 1999.
- COYLE JT., DUMAN RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. **Neuron.** 38(2);157-60; 2003.
- CRADDOCK N., DAVE S., GREENING, J. Association Studies of Bipolar Disorder. **Bipolar Disord.** 3;284–98, 2001.
- CROSS CE., VALACCHI G., et.al. Environmental Oxidant Pollutant Effects on Biologic System. **Am J Respir Crit Care Med.** 166(112);S44-50, 2002.
- CRUZ APM., ZANGROSSI H., et.al. Modelos Animais de Ansiedade: Implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. *Psicologia: Teoria e Pesquisa.* 13(3);269-78, 1997.
- CRYAN JF, MARKOU A., LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci.** 23;238-45, 2002.
- CUNHA JM., MASUR J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacol.** 16;259-67, 1978.
- CUNHA AB, FREY BN. "Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes." **Neurosci Lett.** 398(3);215-9, 2006.
- D'AQUILA PS, BRAIN P, WILLNER P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiol Behav.** 56;861–7, 1994.
- DECKER S., GRIDER G., et.al. Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced hyperlocomotion in the development of an animal model for bipolar illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 24(3);455-62, 2000.
- DIAZGRANADOS N., ZARATE Jr. CA. 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;510–9, 2008.
- DIHR A., KULKARNI SK. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. **Eur J Pharmacol.** 568;177–85, 2007.
- DIXON JF., HOKIN LE. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95;8363–8, 1998.
- DSM-V **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edn.** American Psychiatric Association: Washington, DC. 2012.
- DUMAN RS, MALBERG J, NAKAGAWA S, D'SA C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol Psychiatry.** 48;732–9, 2000.
- DUNLOP, BW., NEMEROFF, CB. The Role of Dopamine in the Pathophysiology of Depression. **Arch Gen Psychiatry.** 64(3);327-37, 2007.
- EDENHARDER R., GRÜNHAGE D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. **Mutat. Res.** 540;1–18, 2003.
- EINAT H., KOFMAN O., BELMAKER RH. Animal models of bipolar disorder From a single episode to progressive cycling models. M. Myslobodsky, I. Weiner (Eds.), **Contemporary Issues in Modeling Psychopathology**, Kluwer Academic Publishers, London pp. 165–179, 2000.

- EINAT H. Establishment of a battery of simple models for facets of bipolar disorder: a practical approach to achieve increased validity, better screening, possible insights into endophenotypes of disease. **Behav. Genet.** 37;244–55, 2007.
- EL-MALLAKH RS., WYATT RJ. The Na, K-ATPase hypothesis for bipolar illness. **Biol Psychiatry.** 37;235-44, 1995.
- EREN I, NAZIROĞLU M., et.al. Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. **Neurochem Res.** 32(3);497-505, 2007.
- FARVOLDEN P., KENNEDY SH., LAM RW. Recent developments in the psychobiology and pharmacotherapy of depression: optimising existing treatments and novel approaches for the future. **Expert Opin. Investig Drugs.** 12;65-86, 2003.
- FELDMAN-NAIM S., TURNER E.H. E LEIBENLUFT E. Diurnal variation in the direction of mood switches in patients with rapid-cycling bipolar disorder. **J. Clin Psychiatry.** 58;79–84, 1997.
- FERNANDEZ SP., NGUYEN M., et.al. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and narigin exert anxiolytic action in mice. **Neurochem. Res.** 34(10);1867-75, 2009.
- FERRO MM., BELISSIMO MI., et.al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J Neurosc Methods.** 148;78–87, 2005.
- FLAISHER-GRINBERG S., KRONFELD-SCHOR N., EINAT H. Models of mania: from facets to domains and from animal models to model animals. **J. Psychopharmacol.** 24(3);437–8, 2010.
- FLECKENSTEIN AE., VOLZ TJ., et.al. New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 47;681–98, 2007.
- FLOYD RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proc Soc Exp Biol Med.** 222(3);236-45, 1999.
- FOSSIER P, BLANCHARD B, et.al. Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation. **Neuroscience.** 93;597-603, 1999.
- FOSTER JD., PANANUSORN B., et.al. Dopamine transporters are dephosphorylated in striatal homogenates and in vitro by protein phosphatase 1. **Mol Brain Res.** 110(1);100-8, 2003.
- FREEMAN MP, FREEMAN SA, MCELROY SL. The comorbidity of bipolar and anxiety disorders: prevalence, psychobiology and treatment issues. **J. Affect Disord.** 68;1-23, 2002.
- FREIS GR., MAGALHÃES PVS. Basic research in Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul. **Rev Psiquiatr Rio Gd Sul.** 32(2);33-4, 2010.
- FREY BN., VALVASSORI SS., et.al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J Psychiatr Neurosci.** 31(5);326-32, 2006.
- GALLY JA., MONTAGUE PR., et.al. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87;3547-51, 1990.
- GAMET-PAYRASTRE L., MANENTI S., et.al. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **Gen. Pharmacol.** 32;279–86, 1999.
- GEDDES JR., BURGESS S., HAWTON K. Long-Term Lithium Therapy for Bipolar Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Am J Psychiatry.** 161(2);217-22, 2004.
- GERBER G., KANGRGA I., et.al. Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. **J. Neurosci.** 9;3606-17, 1989.
- GERSHON E., HAMOVIT J., GUROFF J. A family study of schizoaffective, bipolar I, bipolar II, unipolar, and normal control probands. **Arch. Gen. Psychiatry.** 39;1157–67, 1982.
- GESSA GL, PANI L, et.al. Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania. **Eur Neuropsychopharmacol.** 5;S89-93, 1995.



- GHADRDOOST B., VAFAEI A., et.al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. **Eur J. of Pharmacol.** 66(1-3);222-9; 2011.
- GIAMBALVO CT. Mechanisms Underlying the Effects of Amphetamine on Particulate PKC Activity. **Synapse.** 51;128–39, 2004.
- GIJSMAN HJ., GEDDES JR., RENDELL JM. Antidepressants for Bipolar Depression: a Systematic Review of Randomized, Controlled Trials. **Am J Psychiatry.** 161(9);1537-47, 2004.
- GIORDANO G., SÁNCHEZ-PÉREZ AM., et.al. Activation of NMDA receptors induces protein kinase A-mediated phosphorylation and degradation of matrix 3. Blocking these effects prevents NMDA-induced neuronal death. **J. Neurochem.** 94;808-18, 2005.
- GITLIN MJ., SWENDSEN J., et.al. Relapse and impairment in bipolar disorder. **Am. J. Psychiatry.** 152;1635–40 1995.
- GNEGY ME., HONG P., FERRELL ST. Phosphorylation of neuromodulin in rat striatum after acute and repeated, intermittent amphetamine. **Brain Res Mol Brain Res.** 20(4);289–98, 1993.
- GOULD TJ., KEITH RA., BHAT RV. Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine induced open-field in two inbred strains of mice. **Behav Brain Res.** 118;95-105, 2001.
- GOODWIN GM. **Evidence-Based Guidelines for Treating Bipolar Disorder: Recommendations from the British Ass. for Psychopharmacol.** 17;149-73, 2003.
- GOSHEN, I., YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. **Front. Neuroendocrinol.** 30(1);30-45;2009.
- GRAAE L, KARLSSON R, PADDOCK S. Significant association of estrogen receptor binding site variation with Bipolar disorder in Females. **PLoS One.** 7(2);e32304, 2012.
- GRAPPI S., MARCHESI G., et.al. Morphine sensitization as a model of mania: Comparative study of the effects of repeated lithium or carbamazepine administration. **Pharmacol Biochem Behav.** 99(4);749-58, 2011.
- GREEN EK., RAYBOULD R., MACGREGOR S. Genetic variation at brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with rapid cycling in a UK bipolar disorder case-control sample of over 3000 individuals. **Br. J. Psychiatry.** 188;21-5, 2006.
- GRONLI J., FISKE E., et.al. Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. **Behav Brain Res.** 181;42–51,2007.
- GUIMARÃES FS. **Medicamentos antidepressivos e estabilizadores do humor.** In: Graeff FG, Guimarães FS. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.93-122.
- HANH CG, UMAPATHY, W., et.al. Lithium and valproic acid treatments reduce PKC activation and receptor-G protein coupling in platelets of bipolar manic patients. **J Psychiatr Res.** 39(4);355-63, 2005.
- HARKIN A., CONNOR TJ., et.al. Nitric oxide inhibitors augment the effects of serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 14;274–81, 2004.
- HASHIOKA S., KLEGERIS A., et al. Antidepressants inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. **Exp Neurol.** 206;33–42, 2007.
- HENINGER GR., DELGADO PL., CHARNEY DS. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. **Pharmacopsychiatry.** 29;2-11, 1996.
- HENN FA., VOLLMEYER B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? **Biol. Psychiatry.** 56;146-50, 2004.
- HERMAN L., HOUGLAND T., EL-MALLAKH RS. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. **Neurosci Biobehav Rev.** 31;874-81, 2007.
- HIRSCHFELD RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J. Clin. Psychiatry.** 61(6);S4–6, 2000.

- JIANG ZY, WOOLLARD AC, WOLFF SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**. 26(10);853-6, 1991.
- JOCA SR., GUIMARAES, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacol (Berlin)**. 185;298–305, 2006.
- JOELS M, KARST H, et.al. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**. 7;221–31, 2004.
- JOHNSON LA., GUPTARROY B., et.al. Regulation of Amphetamine-stimulated Dopamine Efflux by Protein Kinase C  $\beta$ . **J Biol Chem**. 280(12);10914-19, 2005.
- JONES SH. Circadian rhythms, multilevel models of emotion and bipolar disorder — an initial step towards integration? **Clin. Psychol. Rev.** 21;1193–209,2001.
- JOSEPH R. Frontal lobe psychopathology: Mania, depression, confabulation, catatonia, perseveration, obsessive compulsions, and schizophrenia. **Psychiatry**. 62;138-72, 1999.
- JUDD LL., AKSISKAL HS., et.al. The long term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar disorder. **Arch Gen Psychiatry**. 59;530-7, 2002.
- JUDD LL, SCHETTLER HS, et.al. Residual symptoms recovery from major affective episodes in bipolar disorder and rapid episode relapse/recurrence. **Arch Gen Psychiatry**. 65(4);338-94, 2008.
- JUNG M., WATSON DG., Simpkins JW. Suppression of protein kinase C<sub>mediates</sub> 17 $\beta$ estradiol-induced neuroprotection in an immortalized hippocampal cell line. **J Neurochem**. 95;745-55, 2005.
- KANDEL ER. Disorders of mood: Depression, mania and anxiety disorders. In Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (Eds.) **Principles of neural science**. New York: McGraw-Hill. 4ed. 1209-1255, 2000.
- KANTOR L., GNEGY ME. Protein Kinase C Inhibitors Block Amphetamine-Mediated Dopamine Release in Rat Striatal Slices. **JPET**. 284;592–8, 1997.
- KAREGE F, VAUDAN G, et.al. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Brain Res Mol Brain Res**. 136;29-37, 2005.
- KATO T., KATO N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. **Bipolar Disord**. 2(3);180-90, 2000.
- KAYSER S., BEWERNICK BH., et.al. Antidepressant effects, of magnetic seizure therapy and electroconvulsive therapy, in treatment-resistant depression. **J. Psychiatric Research**. 45;569-76, 2011.
- KECK PE Jr. The management of acute mania. **BMJ**. 327(7422);1002-3, 2003.
- KESSLER RC. The epidemiology of dual diagnosis. Impact of Substance Abuse on the Diagnosis, Course, and Treatment of Mood Disorders. **Biol Psychiatry**. 56(10);738-48, 2004.
- KRASS M., WEGENER G., et.al. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. **Behav Brain Res**. 218;57-63, 2011.
- KUBERA M, MAES M., et.al. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subject to the chronic mild stress model of depression. **J. Affec Disord**. 63;171-8, 2001.
- KUBERA M, KENIS G, et.al. Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6. **International Immunopharmacol**. 4;185-92, 2004.
- KUHN DM, ARTHUR REJ. Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide. **J. Neurochem**. 67;1072-7, 1996.
- KULOGLU M., USTUNDAG B., et.al. Lipid peroxidation and enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorders. **Cell Biochem. Funct**. 20;171–5, 2002.
- KUMAR A., GARG R., et.al. Nitric oxide mechanism in protective effect of imipramine and venlafaxine against acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. **Neurosc Lett**. 467;72–5, 2009.

- LAFER B., SOARES MBM. Tratamento da depressão bipolar. **Rev. Psiq. Clín.** 32(1);49-55, 2005.
- LAMPE L., SLADE T., et.al. Social phobia in the Australian National Survey of Mental Health and Well-Being (NSMHWB). **Psychol. Med.** 33;637–46, 2003.
- LI Y., LUIKART BW., et.al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. **Neuron.** 59;399–412, 2008.
- LIMA MS., TASSI J., et.al. Epidemiologia do transtorno bipolar. **Rev. Psiquiatr. Clín.** 32(1);15-20, 2005.
- LOPES, AD., MURRAY, CJL. The global border of disease. **Nature Med.** 4;1241-3, 1998.
- MA J., LUO XD., et.al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **J. Nat. Prod.** 66;983–6, 2003.
- MA J., YANG H., et.al. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** 52;5873–8, 2004.
- MA X., JANG D., et.al. Social Isolation-Induced Aggression Potentiates Anxiety and Depressive-Like Behavior in Male Mice Subjected to Unpredictable Chronic Mild Stress. **PLoS One.** 6(6);e20955, 2011.
- MACHADO-VIEIRA R., SCHWARTZHAUPT AW., et.al. Neurobiologia do transtorno de humor bipolar e tomada de decisão na abordagem psicofarmacológica. **R. Psiquiatr.** 25(1);88-105, 2003.
- MACHADO-VIEIRA R., ANDREAZZA AC., et.al. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: A possible role for lithium antioxidant effects. **Neurosc Lett.** 421;33–6, 2007.
- MAES M., CALABRESE J., et.al. Effects of subchronic treatment with valproate on 1-5 HTP-induced cortisol responses in mania: evidence for increased central serotonergic neurotransmission. **Psychiatr Res.** 71;67-76, 1997.
- MAES M., KUBERA M., et.al. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. **Neuroendocrinol Lett.** 32(1);7-24, 2011.
- MALKESMAN O., AUSTIN, DR. Reverse translational strategies for developing animal models of bipolar disorder. **Dis Model Mech.** 2(5-6);238–45, 2009.
- MANJI HK., POTTER WZ., LENOX RH. Signal transduction pathways: molecular targets for lithium's actions. **Arch Gen Psychiatry.** 52;531–43, 1995.
- MANJI HK., BERSUDSKY Y., et.al. Modulation of Protein Kinase C Isozymes and Substrates by Lithium: The Role of Myo-inositol. **Neuropsychopharmacol.** 15(4);370-81, 1996.
- MANJI HK., LENOX RH. Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic depressive illness. **Biol. Psychiatry.** 46(10);1328-51, 1999.
- MANJI HK., CHEN G. PKC, MAP kinses and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. **Mol. Psychiatry.** 7(1);46-56, 2002.
- MANSELL W., PEDLEY R. The ascent into mania: A review of psychological processes associated with the development of manic symptoms. **Clin Psychol Rev.** 28;494-520, 2008.
- MANTOVANI M., PÉRTILE R., et.al. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosc Lett.** 343;1–4, 2003.
- MASON GF., SANACORA G., et.al. Distinct alterations in cortical amino acid levels in unipolar and bipolar depression assessed with MRS. **Soc Neurosci Abstract** 431;5, 2000.
- MARTHUR R., BORSINI F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav.** 84;436–52, 2006.
- MCDONALD BJ, CHUNG HJ, HUGANIR RL. Identification of protein kinase C phosphorylation sites within the AMPA receptor GluR2 subunit. **Neuropharmacol.** 41(6);672-9, 2011.

- MCGUFFIN P., RIJSDIJK F., ANDREW M. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. **Arch. Gen. Psychiatry.** 60;497–502, 2003.
- MEOTTI FC., LUIZ AP., et.al. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **J. Pharmacol Exp Ther.** 316;789–96, 2006.
- MEOTTI FC., POSSER T., et.al. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. **Biochem Pharmacol.** 74;924–31.2007.
- MEOTTI FC., SENTHILMOHAN R., et.al. Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Implications for the pharmacological effects of flavonoids. **Free Radical Biol. & Med.** 44;109–20, 2008.
- MERIKANGAS KR., CHAKRAVARTI A., MOLDIN SO. Future of genetics of mood disorders research. **Biol. Psychiatry.** 52;457–77. 2002.
- MERIKANGAS KR, AKISKAL HS, et.al. Lifetime and 12-month prevalence of Bipolar Spectrum Disorder in the national comorbidity survey replication. **Arch Gen Psychiatry.** 64(5);543-52, 2007.
- MEZADRI T.J., BATISTA G.M. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **J. Neurosc Methods.** 195(2);200-5; 2011.
- MICHAELIS EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog. Neurobiol.** 54;369–15, 1998.
- MIDDLETON JR.E., KANDASWAMI C., THEOHARIDES TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.** 52;673–751; 2000.
- MILLER AH, MALETIC V, RAISON CL. Inflammation and its discontents: the role cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry.** 65;732-41, 2009.
- MONJE FJ, CABATIC M, et.al. Constant Darkness Induces IL-6-Dependent Depression-Like Behavior through the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. **J Neurosc.** 31(25);9075–83, 2011.
- MONLEON SD., AQUILA P., et.al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. **Psychopharmacol.** 117;435-57, 1995.
- MORENO RA., MORENO DH., RATZKE R. Diagnóstico, tratamento e prevenção da mania e da hipomania no transtorno bipolar. **Rev Psiquiatr Clín.** 32(1);S39-48, 2005.
- MÖSSNER R, MIKOVA O., et.al. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. **World J Biol Psychiatry.** 8(3);141-74, 2007.
- MÜLLER-OERLINGHAUSE B., BERTHOFFER A., BAUER M. Bipolar disorder. **Lancet.** 359;241-47, 2002.
- MURY M., VERDOUX H., BOURGEOIS M. Comorbidity of bipolar and eating disorders. Epidemiologic and therapeutic aspects. **Encephale.** 21;545–553, 1995.
- NAKATA K., UJIKE H., et.a. Association study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. **Neurosc Lett.** 337;17–20, 2003.
- NATUSCH C, SADANANDA M, SCHWARTING RKW. Acute effects of MDMA on 50-kHz vocalization in male Wistar rats. **Neuroscience Meeting Planer.** Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.
- NATUSCH C, SCHWARTING RKW. Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 96;251–59, 2010.
- NESTLER EJ., GOULD E., MANJI H. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biol Psychiatry.** 52(6);503-28, 2002a.
- NESTLER EJ, BARROT M, et.al. Neurobiology of Depression. **Neuron.** 34;13-25, 2002b.
- NESTLER EJ., CARLEZON Jr. WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry.** 59(12);1151-9, 2006.
- NEVES-PEREIRA M., MUNDO E., MUGLIA P. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. **Am. J. Hum. Genet.** 71;651–5, 2002.

- NEMEROFF CB. New directions in the development of antidepressants: the interface of neurobiology and psychiatry. **Hum Psychopharmacol Clin Exp.** 17;S13–16, 2002.
- NEUMANN ID., WEGENER G. et.al. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? **Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 35;1357–75, 2011.
- NICULESCU AB 3rd, SEGAL DS, et.al. Identifying a series of candidate genes for mania and psychosis: a convergent functional genomics approach. **Physiol Genomics.** 4(1);83-91, 2000.
- NISHIZUKA Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature.** 334;661-5, 1988.
- NIVOLI AM., COLOM F., et.al. New treatment guidelines for acute bipolar depression: a systematic review. **J. Affect Disord.** 129(1-3);14-26, 2011.
- O'BRIEN SM., SCULLY P., et.al. Plasma cytokines profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitors therapy. **J. Psychiatr. Res.** 41(3-4);326-31; 2007.
- O'DONNELL KC., GOULD TD. The Behavioral Actions of Lithium in Rodent Models: Leads to Develop Novel Therapeutics. **Neurosci Biobehav Rev.** 31(6);932–62, 2007.
- OZCAN M., YILMAZ B., et.al. Hippocampal long-term potentiation (LTP) is reduced by a coplanar PCB congener. **Neurotoxicol.** 25;981–8, 2004.
- PALMER RM., FERRIGE AG., MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 327(6122);524-6, 1987.
- PAPP M, GRUCA P. et.al. Effect of Agomelatine in the Chronic Mild Stress Model of Depression in the Rat. **Neuropsychopharmacol.** 28;694–703, 2003.
- PAYKEL ES. Stress and affective disorders in humans. **Semin. Clin. Neuropsychiatry** 6;4–11, 2001.
- PEET M., PETERS S. Drug-induced mania. **Drug Safety.** 12;146–53, 1995.
- PEREIRA M., SIBA I.P., et.al. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 35;7- 1636–44, 2011.
- PERRY W., MINASSIAN A., et.al. Quantifying over-activity in bipolar and schizophrenia patients in a human open field paradigm. **Psychiatry Res.** 178;84–91, 2010.
- PETIT-DEMOULIERE B., CHENU F. E BOURIN, M. Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. **Psychopharmacol.** 177;245-55, 2005.
- PETTY F. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. **J. Affect Disord.** 34(4);275-81,1995.
- PETTY F., RUSH AJ., et.al. Plasma GABA Predicts Acute Response to Divalproex in Mania. **Biol Psychiatry.** 39;278-84,1996.
- PILETZ JE., DEMET E., et.al. Disruption of circadian MHPG rhythmicity in major depression. **Biol Psychiatry.** 35;830–42, 1994.
- PITTENGER C, DUMAN RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacol.** 33;88-109, 2008.
- PORTIFORS CV. Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rats and Mice. **J. Am. Assoc. Lab Anim Sci.** 46;28-34,2007.
- PORSOLT RD, ANTON G., et.al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol.** 47(4);379–91, 1978.
- POST RM. "Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications." **J Psychiatr Res.** 41(12);979-90, 2007.
- PRICE ML, KYRBY LG., et.al. Evidence for corticotropin-releasing factor regulation of serotonin in the lateral septum during acute swim stress: adaptation produced by repeated swimming. **Psychopharmacol.** 162(4);406-14, 2002.
- RAMAN IM., TONG G., JAHR CE.  $\beta$ -Adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. **Neuron.** 16;415–21, 1996.

- RAMPELLO L., NICOLETTI G., RAFFAELE R. Dopaminergic hypothesis for retarded depression: a symptom profile for predicting therapeutical response. **Acta Psychiatr. Scand.** 84;552–4, 1991.
- RAUPP IM., SERENIKI A., et.al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with Erythrina velutina extract in the elevated plus-maze test. **J Ethnopharmacol.** 118(2);295-9, 2008.
- REGIER DA., RAE DS., NARROW WE. Prevalence of anxiety disorders and their comorbidity with mood and addictive disorders. **Br. J. Psychiatry.** 173;24–8, 1998.
- REUL JMHM, STEC I, et.al. Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. **Endocrinol.** 133;312-20, 1993.
- RIPOLL N., DAVID DJP., et.al. Antidepressant like effects in various mice strains in the tail suspension test. **Behav Brain Res.** 143;193–200, 2003.
- ROSA AR., FRANCO C., et.al. Functional impairment in patients with remitted bipolar disorder. **Psychother Psychosom.** 77;390–2, 2008.
- ROSA AR., REINARES M., et.al. Clinical predictors of functional outcome of bipolar patients in remission. *Bipolar Disord.* 11(4);401–409, 2009.
- RUHÉ HG, MASON NS, SCHENE AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. **Mol Psychiatry.** 12;331-59, 2007.
- SAARELAINEN T., HENDOLIN P., et.al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **J Neurosci.** 23;349–57, 2003.
- SABIONI P., BARETTA IP., et.al. The antimanic-like effect of tamoxifen: Behavioural comparison with other PKC-inhibiting and antiestrogenic drugs. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 32(8);1927-31, 2008.
- SADANANDA M, WÖHR M, SCHWARTING RKW. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. **Neurosci Lett.** 435(1);17-23, 2008.
- SAIRANEN M., LUCAS G., et.al. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. **J Neurosci.** 25;1089–94, 2005.
- SALUM C., RAISMAN-VOZARI R., et.al. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. **Brain Res.** 1198;27–33, 2008.
- SANACORA G., GUEORGUIEVA R., EPPERSON CN. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. **Arch Gen Psychiatry.** 61;705-13, 2004.
- SEDLAK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** 25(1);192-205, 1968.
- SCHWEIZER MC, HENNIGER MSH, SILLABER I. Chronic Mild Stress (CMS) in Mice: Of Anhedonia, 'Anomalous Anxiolysis' and Activity. **PLoS One.** 4(1);e4326, 2009.
- SHIFMAN S., BRONSTEIN M., STERNFELD M. COMT: a common susceptibility gene in bipolar disorder and schizophrenia. **Am. J. Med. Genet.** 128;61–4, 2004.
- SHIH JC. Molecular basis of human MAO A and B. **Neuropsychopharmacol.** 4(1);1-7, 1991.
- SHIMOSAKI S., TSURUNAGA Y., et.al. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from Myrica rubra leaf extracts in vitro and in vivo. **Nat Prod Res.** 25(9);374-80, 2011.
- SHIRAYAMA Y., CHEN AC., et.al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci.** 22;3251–61, 2002.
- SHISLAK CM., PERSE T., CRAGO M. Coexistence of bulimia nervosa and mania: a literature review and case report. **Compr. Psychiatry.** 32;181–4, 1991.
- SCHMIDT HD, DUMAN RS. Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models. **Neuropsychopharmacol.** 35;2378–91, 2010.

- SHIPPENBERG TS., MILLAN MJ., et.al. Involvement of  $\beta$ -endorphin and  $\mu$ -opioid receptors in mediating the aversive effect of lithium in the rat. **European J. Pharmacol.** 154(2);135-44, 1988.
- SIGEL E. Functional modulation of ligand-gated GABAA and NMDA receptor channels by phosphorylation. **J. Recept Signal Transduct Res.** 15 ;325-32, 1995.
- SILVA RH., ABILIO VC., et al. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacol.** 46(6);895–903, 2004.
- SIMPSON SG., FOLSTEIN SE., et.al. Bipolar II: the most common bipolar phenotype? **Am. J. Psychiatry.** 150;901-3, 1993.
- SMITH GE, GRIFFITHS LA. Metabolism of myricitrin and 3,4,5-trihydroxyphenylacetic acid. **J. Biochem.** 118(3);53–4, 1970.
- SMITH RS. The macrophage theory of depression. **Med hypotheses.** 35;298-306, 1991.
- SOUZA, FGM. Tratamento da depressão. **Rev. Bras. Psiquiatria.** 21;18-23, 1999.
- SOUZA FGM. Tratamento do transtorno bipolar: eutímia. **Rev Psiquiatr Clín.** 32 (1);S63-70, 2005.
- SKALISZ LL., BEIJAMINI V., ANDREATINI R. Effect of *Hypericum perforatum* on marble-burying by mice. **Phytother. Res.** 18(5);399-402, 2004.
- STAHL SM. **Psicofarmacologia. Bases Neurocientíficas e Aplicações práticas.** 2º Ed. Medsi. p191-287, 2002.
- STEPHEN E., ZEPF RA., WOODS AG. The Symptoms, Neurobiology and current pharmacological treatment of depression. **J. Neurosc Nur.** 37(2);102-7, 2005.
- STERU L., CHERMAT R., et.al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol.** 85;367-70, 1985.
- SULTZER DL., CUMMINGS JL. Drug-induced mania—causative agents, clinical characteristics and management. A retrospective analysis of the literature. **Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.** 4;127–43, 1989.
- SZABO S. The creative and productive life of Hans Selye: a review of his major scientific discoveries. **Experientia.** 41;564–7, 1985.
- SZABO S., MACHADO-VIEIRA R. et.al. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of Mania. **Neuropharmacol.** 56;47–55, 2009.
- THOMAS AJ., DAVIS S., et.al. Increase in interleukin-1B in late-life depression. **Am J. Psychiatry.** 162(1);175-7;2005.
- THORPE LW., WESTLUND KN., et.al. Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. **J. Histochem. Cytochem.** 35(1);23-32, 1987.
- TSIGOS C., CHROUSOS GP. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Neuroendocrine Factors and Stress. **J Psychosom Res.** 53;865-71, 2002.
- TOMASIEWICZ HC., MAGUE SD., et.al. Behavioral effects of short-term administration of lithium and valproic acid in rats. **Brain Res.** 1093;83–94, 2006.
- TONDO I., ISACSSON G., BALDESSARINI R. Suicidal behaviour in BPD: risk and prevention. **CNS Drugs.** 17;491–511, 2003.
- TONELLI D., PEREIRA M., et.al. The antimanic-like effect of phenytoin and carbamazepine on methylphenidate-induced hyperlocomotion: role of voltage gated sodium channels. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** doi: 10.1111/fcp.12022
- TUNNICLIFF, G., MALATYNSKA, E. Central GABAergic systems and depressive illness. **Neurochem Res.** 28;965–76, 2003.
- Von KNORRING L., PERRIS C., et.al. Pain as a symptom in depressive disorders. Part II: Relationship to personality traits as assessed by means of KSP. **Pain.** 17;377-84, 1983.
- VARTY GB., COHEN-WILLIAMS ME., HUNTER JC. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. **Behav Pharmacol.** 14(1);87-95; 2003.
- Von KNORRING L., PERRIS C., et.al. Pain as a symptom in depressive disorders and its relationship to platelet monoamine oxidase activity. **J. Neural Transm.** 60;1-9, 1984.



- WANG HY., FRIEDMAN E. Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorder brains. **Biol. Psychiatry.** 40;568–75, 1996.
- WATSON DG., LENOX RH. Chronic lithium-induced downregulation of MARCKS in immortalized hippocampal cells: Potentiation by muscarinic receptor activation. **J Neurochem.** 67;767–77, 1996.
- WATSON S., MACKIN P. **HPA axis function in mood disorders.** Pathophysiological basis of mood disorders. Elsevier. 166-170; 2006.
- WEHR TA., SACK D., et.al. Circadian rhythm disturbances in manicdepressive illness. **Fed. Proc.** 42;2809–14,1983.
- WEGENER G., VOLKE V., ROSENBERG R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. **Br. J. Pharmacol.** 130;575–80, 2000.
- WHITE FJ., KALIVAS PW. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. **Drug and Alcohol Dependence.** 51;141-53, 1998.
- WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology.** 134(4);319-29, 1997.
- WILLNER P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiol.** 52(2);90-110, 2005.
- WINTINK AJ., BRUDZYNSKI SM. The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 70;317–23, 2001.
- WÖHR M., HOUX B., et.al. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. **Physiology & Behavior.** 93;766–76, 2008.
- YADID G., NAKASH R. et.al. Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. **Prog Neurobiol.** 62;353-78, 2000.
- YATHAM LN., LIDDLE PF., et.al. PET Study of [18F]6-Fluoro-L-Dopa Uptake in Neuroleptic and Mood-Stabilizer-Naive First-Episode Nonpsychotic Mania: Effects of Treatment With Divalproex Sodium. **Am J Psychiatry.** 159;768–74, 2002.
- YATHAM LN., KENNEDY SH., et.al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies. **Bipolar Disord.** 7(3);S5-69, 2005.
- YILDIZ A., GULERYUZ S., et.al. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania. A double blind, placebo-controlled trial of tamoxifen. **Arch. Gen. Psychiatry.** 65(3);255-63, 2008.
- YOKOMIZO A, MORIWAKI M. Transepithelial permeability of Myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 69(9);1774-6, 2005a.
- YOKOMIZO A, MORIWAKI M. Myricitrin Degraded by Simulated Digestion Inhibits Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 69(4);693-9, 2005b.
- YOUNG JW., HENRY BL., GEYER MA. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. **British J Pharmacol.** 164(4);1263-84, 2011.
- ZARATE CA., MANJI HK. Protein Kinase C Inhibitors: Rationale for Use and Potential in the Treatment of Bipolar Disorder. **CNS Drugs.** 23(7);569-82, 2007.
- ZARATE JR. CA., SINGH JB., et.al. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. **Bipolar Disord.** 9;561-70, 2007.
- ZARATE CA., MANJI HK. Protein Kinase C Inhibitors. Rationale for Use and Potential in the Treatment of Bipolar Disorder. **CNS Drugs.** 23(7);569-82, 2009.
- ZEEB FD, ROBBINS TW, WINSTANLEY CA. Serotonergic and dopaminergic modulation of gambling behavior as assessed using a novel rat gambling task. **Neuropsychopharmacol.** 34;2329–43, 2009.
- ZHONG X, OTSUKA H, et al. Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry.** 46;943-46, 1997.



## ANEXO I

# CERTIFICADO DO CEUA SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ UFPR



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 385

### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

### CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.085922/2009-57

APROVADO: 10/07/2009 – R.O. 06/2009

TÍTULO:

Avaliação do potencial efeito antimaníaco, antidepressivo e antipsicótico da miricitrina em modelos animais

AUTORES:

Roberto Andreatini, Irinéia P. Baretta, Bruno Jackson Martynhak, Marcela Pereira

DEPARTAMENTO:

Farmacologia

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi  
Coordenadora do CEEA