

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIAN CRISTHIANE MONTEIRO PEREIRA

**POTENCIAL EFEITO ANTIMANÍACO DA QUERCETINA NA HIPERLOCOMOÇÃO  
INDUZIDA POR OUABAÍNA EM MODELOS ANIMAIS DE MANIA**

CURITIBA

2017

VIVIAN CRISTHIANE MONTEIRO PEREIRA

**POTENCIAL EFEITO ANTIMANÍACO DA QUERCETINA NA HIPERLOCOMOÇÃO  
INDUZIDA POR OUABAÍNA EM MODELOS ANIMAIS DE MANIA**

Monografia apresentada à disciplina BMed006 - Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial à conclusão do Curso de Biomedicina, setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2017

## RESUMO

O transtorno bipolar é uma doença crônica caracterizada por episódios recorrentes de depressão e mania/hipomania, os quais apresentam um grande prejuízo funcional e social ao paciente, além de elevada taxa de mortalidade e morbidade. Aliado à psicoterapia, dentre os principais tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente para o transtorno bipolar destacam-se os estabilizadores de humor, principalmente o lítio e o ácido valpróico, e antipsicóticos de segunda geração, como a quetiapina, a risperidona e a olanzapina. Entretanto, o tratamento atual para o transtorno bipolar envolve a ocorrência de diversos efeitos colaterais importantes, o que causa uma grande ocorrência de abandono do tratamento por parte dos pacientes. Estudos recentes indicam que a fisiopatologia do transtorno bipolar está associada ao estresse oxidativo, principalmente nas áreas cerebrais responsáveis pelo controle do humor. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito tipo antimaníaco da quercetina, um flavonóide antioxidante, em modelos animais de mania. Para isto, serão utilizados camundongos da linhagem Swiss, fornecidos pelo Biotério Central da UFPR, onde serão submetidos a cirurgia estereotáxica para a implantação de uma cânula-guia, a fim de produzir um modelo de hiperlocomoção induzido pela injeção icv de ouabaína, um derivado esteróide que atua como inibidor específico da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ , modelo este já consagrado e padronizado em ratos. A risperidona, um antipsicótico antagonista do receptor D2, foi utilizada como controle positivo, e a quercetina foi administrada nas doses de 10 mg/kg e 40 mg/kg via i.p., doses estas que já demonstraram efeitos positivos em outros experimentos realizados em nosso laboratório, confirmando seu efeito anti-oxidante (*in vitro* e *in vivo*), além do seu potencial efeito tipo-antimaníaco em outros modelos animais. Os animais foram submetidos ao Teste da Caixa de Locomoção e ao Teste de Campo Aberto, a fim de se avaliar o efeito de hiperlocomoção provocado pela injeção de ouabaína e os efeitos dos demais fármacos testados, além da possibilidade de padronização do modelo de ouabaína em camundongos, até então não registrado na literatura.

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Dirceu (*in memoriam*), à minha mãe, Esther, ao meu irmão, Victor Hugo, ao meu sobrinho, Pedro Henrique e à Kátia, minha cunhada e irmã.

Aos meus avós maternos, José e Laide.

Aos familiares que tanto apoiaram, incentivaram e torceram pelo meu crescimento e sucesso.

Aos amigos que foram fiéis em todo o tempo.

A mim. Ao meu sucesso. À minha superação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, força, oportunidade de viver e proteção em todo o tempo.

Ao professor Dr. Roberto Andreatini, pela orientação, apoio, incentivo, inspiração, confiança e principalmente por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava mais. Minha paixão pela Neuropsicofarmacologia só aumentou durante esses 4 anos de orientação, e devo isso ao melhor orientador desse mundo.

À pos-doutoranda Ana Paula Segantine, por todo o ensinamento e pelo conhecimento que me proporcionou. Este trabalho só foi possível pela paciência, dedicação e conhecimento dela.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central, Luiz Kae Sales, Lucas Marques, Franciane Nogoceke, Inara Baccaro, Isadora Pozzetti, Andrés Mello, Laura Pulido, Thiago Rodrigues, Cristina Stern (hoje professora do departamento), que me auxiliaram quando precisei e deram todo o apoio necessário para que meu trabalho fosse concluído.

À farmacêutica do Laboratório Central, Silvia, por toda a orientação e ensinamento que me deu durante toda a minha pesquisa. Sem o seu apoio as coisas teriam sido muito mais difíceis.

À todos os professores do curso de Biomedicina, por me proporcionarem tanto conhecimento e aprendizado, e participar ativamente da minha formação como Biomédica.

À todos os professores do Departamento de Farmacologia, por me despertarem dia após dia a paixão pela Farmacologia, onde pretendo atuar e me aperfeiçoar pelos próximos anos da vida.

Às professoras Dra. Janaína Zanovelli e Dra. Mara Cordeiro, por terem aceitado meu convite para compor minha banca e avaliar meu trabalho.

À UFPR, à PRPPG e ao CNPq, por me proporcionar todas as oportunidades e condições para que eu me mantivesse na instituição durante todos esses anos.

À minha mãe, Esther, por ser a melhor mãe do mundo e a pessoa mais guerreira e forte que eu conheço. Por todo o apoio em todos os sentidos, pelo incentivo, pelo orgulho demonstrado e por ter permitido que eu chegasse até aqui. Te amo, mãe!

Á minha psicóloga, Aline Anselmo, e ao meu psiquiatra, João Guilherme Borgio, por ajudarem a manter minha saúde mental minimamente saudável e permitirem que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos, Aline Pereira, Larissa Guimarães, Fernanda Vergara, Jordana Lima, Guilherme Augusto, Tiago Reis, Luciana Vargas, Rafaela Santa Clara, Tássila Zerbini, Bruna Barbosa, Bruna Luvizotto, Julieta Luvizotto, Peterson Freitas, Samya Mehanna, por terem aguentado tantas barras e tantas dificuldades comigo, mas também por terem participado de tantas alegrias e tantas comemorações pelas pequenas e grandes conquistas. Gratidão e amor eterno por vocês!

Ao Daniel Pires, meu namorado, por todo o amor, companheirismo, parceria, lealdade e cumplicidade.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>8</b>
2.1 TRANSTORNO BIPOLAR (TB) .....	8
2.2 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR .....	8
2.3 TRATAMENTO .....	12
<b>3 QUERCETINA</b> .....	<b>15</b>
<b>4 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR OUABAÍNA</b> .....	<b>18</b>
4.1 OUABAÍNA .....	18
4.2 TRANSPORTADOR Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase .....	19
4.3 MODELO ANIMAL .....	20
<b>5 HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
6.1 ANIMAIS .....	22
6.2 DROGAS E TRATAMENTOS .....	22
6.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	23
6.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA .....	23
6.5 ADMINISTRAÇÃO DE OUABAÍNA E VEÍCULO .....	24
6.6 TESTE DA CAIXA DE LOCOMOÇÃO .....	25
6.7 TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD TEST) .....	26
6.8 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DA CÂNULA-GUIA .....	27
6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
7.1 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E DO VEÍCULO (TWEEN 80) NA LOCOMOÇÃO .....	28
7.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA NA HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA PELA OUABAÍNA .....	29
<b>8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>32</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Transtorno Bipolar (TB) caracteriza-se como um grupo de distúrbios afetivos, que em conjunto são caracterizados por depressão, mania ou hipomania. Atualmente estão classificados em: transtorno bipolar tipo I (episódios depressivos e maníacos, sendo diagnosticado com base em um episódio maníaco); Transtorno bipolar tipo II (episódios depressivos e hipomaníacos); Transtorno ciclotímico (sintomas hipomaníacos e depressivos que não satisfazem os critérios para episódios exclusivamente depressivos); e transtorno bipolar não especificado (sintomas depressivos e hipomania, que não cumprem o critério diagnóstico das demais desordens acima mencionadas) (APA, 2013).

O transtorno bipolar tipo II é especialmente difícil para diagnosticar com precisão, devido à dificuldade na diferenciação entre esse transtorno e a depressão unipolar recorrente (episódios depressivos recorrentes) em pacientes deprimidos. A identificação de biomarcadores específicos, que representam processos fisiopatológicos que diferem o transtorno bipolar da depressão unipolar podem auxiliar na definição do diagnóstico de transtorno bipolar e fornecer alvos biológicos para o desenvolvimento de tratamentos novos e personalizados (PHILLIPS; KUPFER, 2013).

Apesar de novas descobertas e avanços no estudo das bases neurobiológicas e abordagens terapêuticas no transtorno bipolar, elevadas taxas de recorrência, sintomas subsindrômicos persistentes e refratariedade terapêutica são aspectos clínicos desafiadores nestas doenças (MACHADO-VIEIRA E SOARES, 2007). Sendo assim, a busca por substâncias capazes de induzirem uma rápida e sustentável melhora do quadro clínico destes transtornos e que apresentem poucos efeitos colaterais se faz necessária. Um dos objetivos deste trabalho é verificar os efeitos de um flavonóide já consagrado na literatura por seu efeito neuroprotetor, a quercetina, em um modelo animal de mania.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. TRANSTORNO BIPOLAR (TB)

O transtorno bipolar (TB) é uma desordem psiquiátrica afetiva, a qual atinge cerca de 2% das pessoas em todo o mundo (MERIKANGAS et al., 2011). Pacientes psiquiátricos com TB oscilam entre estados de depressão e mania, durante o qual uma grande variedade de sintomas estão presentes. Os tratamentos atuais são limitados e, em particular, os déficits neurocognitivos muitas vezes permanecem sem tratamento (VAN ENKHUIZEN et al., 2015). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (APA, 2013), as alterações nas atividades e energia são necessários para o diagnóstico de um episódio maníaco, associados a um "aumento da atividade dirigida a objetivos" ou "agitação psicomotora".

### 2.2 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR

Os mecanismos envolvidos na complexa lista de sintomas do TB ainda não estão completamente definidos, complicando o desenvolvimento de alvos para tratamento. No entanto, vários mecanismos foram elucidados, que provavelmente medeiam ambos os estados de mania e depressão no TB. A hipótese do desequilíbrio catecolaminérgico-colinérgico de níveis funcionais das catecolaminas são aumentados durante os estados maníacos, enquanto o aumento da função colinérgica é mais relevante à depressão (VAN ENKHUIZEN et al., 2015).

O transtorno bipolar implica em custos elevados para a sociedade, principalmente devido a longos períodos de ausência laboral devido à doença (EKMAN et al., 2013). O curso da doença varia consideravelmente entre indivíduos. Alguns pacientes estão livres de recidivas durante décadas, enquanto outros frequentemente apresentam episódios depressivos recorrentes ou episódios

maníacos prolongados graves (GOODWIN, 2009). Enquanto algumas pessoas se recuperam completamente entre os episódios de alteração de humor, outros sofrem com sintomas persistentes e debilitantes.

Em estudos recentes, há indícios de que o TB apresente comorbidades sistêmicas diferentes dos demais transtornos psiquiátricos, aumentando a taxa de mortalidade entre os pacientes com TB, tais como doenças cardiovasculares, DPOC, influenza e pneumonia, além de lesões não intencionais, suicídio e câncer principalmente em mulheres (CRUMP et al., 2013), além de diabetes tipo II (HAJEK et al., 2015).

Independentemente do subtipo, o TB está associado ao comprometimento funcional profundo, suicídio e múltiplas comorbidades (BELMAKER, 2004; MERIKANGAS et al., 2007). Modelos contemporâneos centrados no cérebro em relação à etiopatologia do TB ressaltam a função neural anômala, circuitos neurais e neuroquímica (STRAKOWSKI et al., 2012; COUSINS; BUTTS; YOUNG, 2009; ANDREAZZA; YOUNG, 2013). Modelos multissistêmicos destacam desequilíbrios na inflamação, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e fatores neurotróficos (FREY et al., 2013; BERK et al., 2011). Recentemente, os estudos que integram essas diferentes abordagens começaram a vincular processos sistêmicos e cerebrais no TB, incluindo desordens cardiovasculares e alterações vasculares ligadas ao estresse oxidativo no TB (GOLDSTEIN, 2017; HATCH et al., 2015).

Enquanto Kraepelin (1921) descreveu pela primeira vez a natureza progressiva do TB, Post (1992) fundamentou as características da compreensão atual da natureza progressiva da fisiopatologia do transtorno. O estudo baseou-se em experimentos que usavam o kindling em modelos animais de convulsão, onde foi demonstrado que, se os agentes exógenos induzissem convulsões suficientemente recorrentes, ocorreriam alterações no SNC que induziriam convulsões endógenas espontâneas no animal. O kindling pode ser induzido por estímulos repetitivos a longo prazo. Desta forma, mostrou-se que a exposição do SNC a desafios múltiplos a longo prazo poderiam alterar permanentemente a atividade neuronal e este era um paradigma não homólogo para o TB, em que vários episódios podiam alterar a atividade neuronal permanente em pacientes com o transtorno. Essa alteração lenta da atividade neuronal subjazia as mudanças progressivas agora observadas em

estudos de neuroimagem e as mudanças progressivas na gravidade dos sintomas. Em um estudo posterior, Post sugeriu que alguns dos desfechos negativos do TB podem ser devidos a uma falha de mecanismos compensatórios endógenos que normalmente minimizariam o impacto de injúrias de caráter endógeno, como a redução da liberação de fatores neurotróficos e neuroprotetores como o BDNF, e o aumento de fatores de morte celular, como a proteína P53 e a BCL2 pró-apoptótica (POST, 2007).

Kapczinski et al. (2008) estenderam esse modelo, incorporando a hipótese da “carga alostática”, processo pelo qual os efeitos combinados de carga genética, estressores do cotidiano e demais fatores agravantes, como o uso de substâncias, se combinam para levar a um processo cumulativo de "desgaste". Essas características combinam com a neuropatologia inata da desordem para lesionar ainda mais os circuitos funcionais do cérebro responsáveis pela modulação e manutenção do humor. Isto resultaria em mudanças estruturais e o declínio cognitivo associado observado, e os circuitos que seriam mais interrompidos resultam na diminuição da capacidade de resposta à terapia que ocorre com a cronicidade. Esse processo neuroprogressivo também está diretamente ligado à crescente vulnerabilidade a futuros episódios de crises, principalmente maníacas, e do surgimento de comorbidades. Desta forma, podemos perceber que os fundamentos bioquímicos da neuroprogressão do TB são multifatoriais e interativos, através da sensibilização ao estresse do meio ambiente e fatores intrínsecos aos pacientes. Os componentes principais incluem o sistema dopaminérgico, citocinas inflamatórias, estresse oxidativo, estresse do retículo mitocondrial e endoplasmático e neurotrofinas, incluindo BDNF (WADEE et al., 2002; POST, 2007; BERK et al., 2008). Há também evidências do envolvimento de alterações epigenéticas, particularmente a metilação de histonas e DNA, levando a efeitos de longa duração na expressão gênica (GRAYSON et al., 2010).

Muitas evidências ligam o TB a uma anormalidade fundamental na geração de energia oxidativa (KATO, 2007). A geração de energia do cérebro é aumentada na mania e diminuída na depressão, sendo este um achado crítico com alta validade clínica (BAXTER et al., 1985), e há evidências do aumento da taxa metabólica basal na mania, independente da ingestão calórica (CALIYURT E ALTIAY, 2009). As

mitocôndrias são organelas intracelulares que desempenham um papel crucial na produção de adenosina trifosfato (ATP) e também servem como reservas de cálcio e reguladores da apoptose (FATTAL et al., 2007; STUCHEBRUKHOV, 2009). Durante o transporte de elétrons ao longo da cadeia transportadora na mitocôndria, os elétrons podem escapar e resultar em uma redução de elétrons de oxigênio molecular para formar um ânion superóxido ( $O_2^-$ ), especialmente no complexo I (NADH: ubiquinona óxido redutase) (GREEN et al., 2004).

Embora ainda não estejam completamente esclarecidas como as mudanças na expressão do gene mitocondrial podem causar o TB, propôs-se que mutações ou polimorfismos de DNA mitocondrial resultem em uma regulação mitocondrial de  $Ca^{2+}$  alterada (KATO, 2007). O cálcio intracelular elevado já foi detectado em indivíduos com TB (BERK et al., 1994). Aumentos nos níveis de cálcio mediados por receptores de glutamato também estão presentes, promovendo alteração na neuroplasticidade e contribuindo para os processos excitotóxicos relatados no TB (BERK et al., 2000; KATO, 2007).

Estudos mais focados relatam uma redução na atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial no córtex pré-frontal pós-morte em pacientes com TB, mas não na esquizofrenia ou depressão maior (ANDREAZZA, 2009). Em termos de disfunção mitocondrial, há evidências de expressão alterada de subunidades deste complexo (KONRADI et al., 2004; SUN et al., 2006). Cheng et al. (2006) sugeriram ligação do cromossomo 19p13 no TB, onde a maioria dos genes subunitários do complexo I estão localizados. Dada a hipótese mitocondrial envolvida no TB, é de grande interesse que o lítio aumente a atividade dos complexos mitocondriais I / II e II / III no tecido cerebral humano (MAURER et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas ao longo da cadeia transportadora de elétrons são capturadas por enzimas antioxidantes. Quando os sistemas antioxidantes mitocondriais e citoplasmáticos são subjugados por níveis elevados de ROS, podem ocorrer danos no DNA, lipídeos (membranas de células e organelas) e proteínas (receptores, fatores de transcrição e enzimas) (LENAZ et al., 2000). Alterações em enzimas antioxidantes foram relatadas no TB, como a atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentada durante as fases maníaca e

depressiva do TB, mas não na eutímia (ANDREAZZA et al., 2007). Isso é corroborado em parte por Machado-Vieira et al. (2007), que relataram aumento da atividade de SOD em pacientes com crise maníaca e não medicados. A atividade da catalase foi diminuída em pacientes eutímicos (ANDREAZZA et al., 2007) e aumentada em pacientes maníacos não medicados (MACHADO-VIEIRA et al., 2007). Curiosamente, o tratamento do TB usando um precursor de glutathione e um eliminador de radicais livres, a N-acetilcisteína (NAC) reduz os sintomas depressivos e melhora o funcionamento e a qualidade de vida (BERK et al., 2007). A atividade da glutathione redutase e GST aumentaram em pacientes em fase tardia em comparação com pacientes e controles em estágio inicial (ANDREAZZA et al., 2009). Esta mudança relacionada ao estágio da biologia oxidativa pode fazer parte da falha progressiva dos mecanismos compensatórios ao longo do tempo e pode, em parte, estar ligada à fenomenologia do processo de estadiamento.

Em contraste, os estudos mostraram aumento da peroxidação lipídica como resultado do estresse oxidativo não compensado, que é independente da fase do transtorno (ANDREAZZA et al., 2007; MACHADO-VIEIRA et al., 2007). Além disso, foram encontrados níveis aumentados de peroxidação lipídica no córtex cingulado de pacientes com TB (WANG et al., 2009). É importante enfatizar que o dano oxidativo aos fosfolípidos das membranas que conduzem à alteração da fluidez pode induzir a morte celular (MAHADIK et al., 2001). Acredita-se que a acumulação do dano oxidativo conduza à morte celular neuronal pela apoptose ou como consequência da agregação de proteínas oxidadas, o que pode resultar em comprometimento dos mecanismos de estabilização do humor.

## 2.3 TRATAMENTO

O tratamento do TB progrediu significativamente nas últimas décadas devido aos avanços tanto na pesquisa pré-clínica quanto na clínica. Grande parte deste progresso está centrado no desenvolvimento de uma nova geração de estabilizadores de humor-anticonvulsivantes (LI et al., 2002). O tratamento

farmacológico do TB inclui o tratamento de estados agudos e o tratamento de manutenção, a fim de impedir novos episódios. Estabilizadores do humor, como o lítio e valproato, são drogas de primeira linha indicadas para a mania e manutenção posterior do tratamento agudo (CHENGAPPA; GOODWIN, 2005). O ácido valpróico e a carbamazepina têm propriedades estabilizadoras de humor bem definidas, enquanto a lamotrigina, o topiramato e a gabapentina são utilizadas para outras variações do transtorno (LI et al, 2002). A adição de um segundo estabilizador de humor (olanzapina ou lamotrigina) ao lítio é eficaz na redução dos sintomas de ansiedade em pacientes com transtorno bipolar com um transtorno de ansiedade ocorrendo simultaneamente (MAINA et al., 2008; SAMALIN; NOURRY; LLORCA, 2011).

Vários estudos têm sugerido que os efeitos neuroprotetores do lítio e do valproato podem ser responsáveis pelos seus efeitos terapêuticos (CHUANG et al., 2002; LI et al., 2002) e um dos mecanismos que implica neste efeito é a indução do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)/via de sinalização TrkB (HASHIMOTO et al., 2002; MANJI; CHEN, 2002).

O uso de antidepressivos padrão para tratar a depressão bipolar é controversa e a base de evidências é inconclusiva (PACCHIAROTTI et al., 2013; KARANTI et al., 2016). A quetiapina pode, portanto, ser prescrita a pacientes com episódios depressivos, predominantemente, como no caso do transtorno bipolar tipo II. Assim, um possível aumento da prescrição de drogas com perfil antidepressivo (como lamotrigina ou quetiapina) podem resultar em mudanças de diagnóstico com relação aos subtipos bipolares.

Sabe-se que os estabilizadores de humor utilizados atualmente afetam os mecanismos associados à neuroprogressão do TB. A lamotrigina, o lítio e o ácido valpróico reduzem o estresse oxidativo (CUI et al., 2007; EREN et al., 2007; KIM et al., 2007; NG et al., 2008) e os antipsicóticos atípicos também reduzem o estresse oxidativo, não só através do antagonismo da dopamina (BERK et al., 2007), mas também através de efeitos diretos sobre as defesas oxidativas. Da mesma forma, o lítio, o ácido valpróico, a lamotrigina, a carbamazepina e os antipsicóticos atípicos, como a quetiapina, compartilham um efeito do aumento do BDNF, embora esses efeitos possam ser via mecanismos secundários (BAI et al., 2003; MARTINOWICH

et al., 2007; CHANG et al., 2009). Outro alvo proposto para a ação do lítio e do ácido valpróico é a proteína quinase C (PKC), pois estes fármacos reduzem a atividade da PKC, que estaria aumentada no episódio maníaco (ARMANI et al., 2014).

Mesmo com o uso adequado dos atuais fármacos indicados para o tratamento de TB, a maioria dos pacientes continua a ter recorrentes episódios de flutuações de humor, sintomas residuais, comprometimento funcional, deficiência psicossocial e comorbidades psiquiátricas. Uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos desta doença é um pré-requisito para o desenvolvimento de novas drogas e sua implementação na prática clínica (ZARATE JUNIOR; SINGH; MANJI, 2006). Os recentes avanços na genética, neurobiologia e nas metodologias farmacológicas têm ajudado no desenvolvimento de modelos animais, os quais são importantes ferramentas para investigar novos sistemas intracelulares que podem estar envolvidos na fisiopatologia específica de desordens psiquiátricas (VALVASSORI et al., 2013).

Considerando os estudos que mostram um aumento consistente de peroxidação lipídica e alterações em enzimas antioxidantes em pacientes com TB, reforçando a hipótese de que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia do TB (OZCAN et al., 2004; FREY et al., 2007), e o papel proposto para a PKC, fármacos com estas atividades têm potencial para uso na mania. A quercetina apresenta estas duas ações e, em nosso laboratório, já foi observado um efeito tipo antimaníaco nas doses de 10 mg/ml e 40 mg/ml nos modelos animais de privação de sono paradoxal (KANAZAWA et al., 2016) e de hiperlocomoção induzida por metilfenidato (KANAZAWA et al., 2017). Portanto, a verificação dos possíveis efeitos neuroprotetores nas vias de estresse oxidativo promovidos pela quercetina deve ser estudado, a fim de ser possivelmente utilizado como adjuvante no tratamento de pacientes não-responsivos ou pouco responsivos aos tratamentos convencionais.

### 3 QUERCETINA

A quercetina, um membro da família dos flavonóides, é um dos antioxidantes mais importantes na dieta e está presente em diversos alimentos, incluindo vegetais, frutas, chá e vinho, bem como em inúmeros suplementos alimentares (KELLY, 2011). Isto inclui a proteção contra várias doenças tais como a osteoporose, doenças cardiovasculares e pulmonares, mas também contra o envelhecimento. A capacidade da quercetina em eliminar espécies altamente reativas, tais como o peroxinitrito e o radical hidroxila é sugerida nesses possíveis efeitos benéficos para a saúde (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

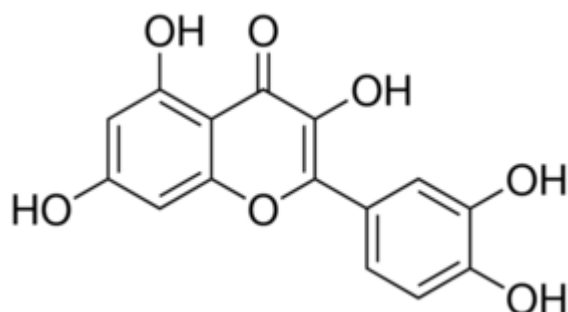


Figura 1: fórmula estrutural da quercetina.

Vários estudos demonstraram que a quercetina pode exercer neuroproteção e antagonizar o estresse oxidativo quando administrado *in vivo*. Por exemplo, a quercetina por via oral (0,5-50 mg / kg) protegeu roedores do estresse oxidativo e da neurotoxicidade induzida por várias substâncias neurotóxicas (ISHISAKA et al., 2011). Entre os metais, a quercetina foi usada para fornecer proteção contra a neurotoxicidade do chumbo, o metilmercúrio, e tungstênio (HU et al., 2008; BARCELOS et al., 2011; LAKROUN et al., 2015). Foi também demonstrado seu efeito neuroprotetor em modelos de hemorragia intracerebral em ratos (ZHANG et al., 2014), e proteção da retina contra danos devido a apoptose na lesão por isquemia e reperfusão em ratos (ARIKAN et al., 2015). Há estudos recentes e

relevantes que mostram que a quercetina melhora a patologia da doença e déficits cognitivos relacionados com doença de Alzheimer em modelo animal da doença de Alzheimer (SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2015).

## 4. MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR OUABAÍNA

### 4.1 OUABAÍNA

A ouabaína é um derivado esteróide cardiotônico, composto por ramnose e ouabagenina, obtido a partir de sementes maduras das plantas *Strophantus gratus*, *Acokanthera ouabaio* e outras plantas da família Apocynaceae. Estudos recentes indicam que um isômero da ouabaína foi identificado como um hormônio endógeno, sintetizado pela glândula adrenal e também pelo hipotálamo, porém seu mecanismo de ação e sua importância fisiológica ainda não foram determinadas (KAWAMURA ET AL., 2001). A ouabaína inibe especificamente o transportador  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , promovendo a extrusão de íons  $\text{Na}^+$  e a intrusão de íons  $\text{K}^+$ , ocasionando um acúmulo intracelular de  $\text{Na}^+$ .

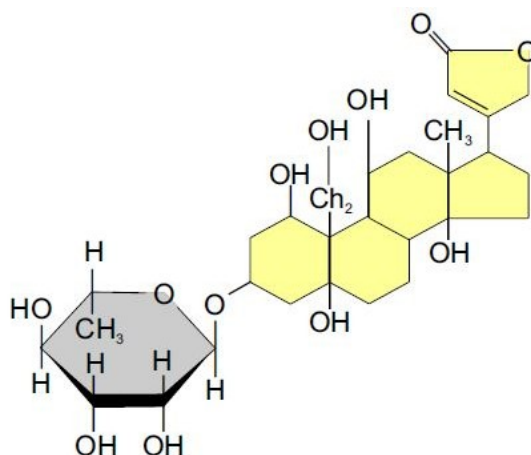


Figura 2: fórmula estrutural da ouabaína.

## 4.2 TRANSPORTADOR $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase

A  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é uma proteína composta por dois polipeptídeos denominados de subunidades alfa e beta (MOBASHERI et al., 2000), estando presente na membrana plasmática de todas as células dos mamíferos. Sua atividade é mediada pela hidrólise de ATP e pela utilização da energia livre para dirigir o transporte de  $\text{K}^+$  para dentro da célula e  $\text{Na}^+$  para fora da célula, em direções opostas aos seus gradientes eletroquímicos (BLANCO; MERCER, 1998; (SCHEINER-BOBIS, 2002).

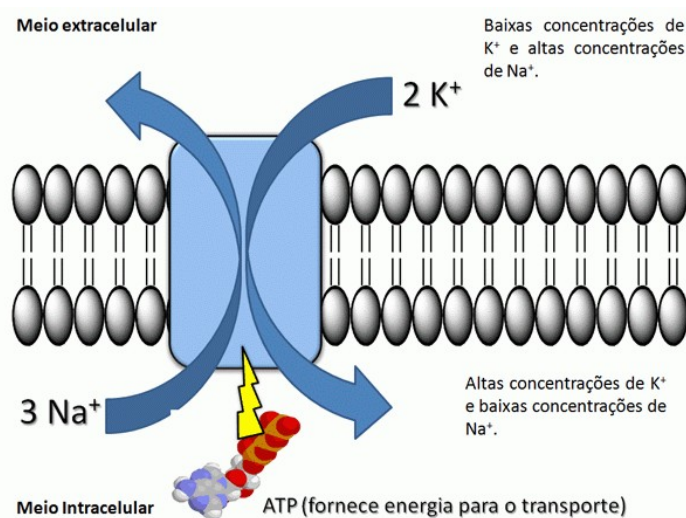


Figura 3: organização funcional do transportador  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, inserido na membrana celular.

O transportador  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é o principal sistema de transporte ativo na maioria das células animais, e sua inibição gera uma condição que favorece o acúmulo intracelular de  $\text{Na}^+$  (MCFADDEN; A BOBICH; ZHENG, 2001). A  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é o maior determinante da concentração citoplasmática de sódio, desempenhando importante papel na regulação do volume celular e do pH citoplasmático, bem como dos níveis de cálcio. É responsável também por uma variedade de processos secundários de transporte, tais como o transporte de sódio dependente de glicose e aminoácidos.

### 4.3 MODELO ANIMAL

O uso de modelos animais na pesquisa pré-clínica tem proporcionado ferramentas importantes para a identificação e estudo de novas substâncias e fármacos com atividade terapêutica, além de auxiliar na elucidação dos mecanismos neurobiológicos dos transtornos psiquiátricos (ANDREATINI, 2002).

O modelo animal de mania induzido por ouabaína foi proposto por El-Mallakh et al. (1995) como um modelo agudo de mania, o qual consiste em uma injeção i.c.v. de ouabaína a qual promove hiperlocomoção nos ratos. A idealização deste modelo se deve ao fato de que em pacientes humanos, a atividade da bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase está diminuída na mania, gerando a hipótese de que este transportador esteja diretamente ligado ao desenvolvimento da patologia (LOONEY; EL-MALLAKH, 1997); ROSE et al., 1998).

A validade de face na maioria dos modelos animais de mania tem priorizado a hiperatividade como sintoma chave (MACHADO-VIEIRA et al., 2004). Devido a estes fatores, a administração i.c.v. de ouabaína induz hiperatividade em ratos, caracterizada principalmente por aumento da atividade locomotora (validade de face), a qual foi normalizada pelo uso de medicamentos validados na clínica, como lítio, carbamazepina e haloperidol (validade de predição) (EL-MALLAKH et al., 2003). Considerando que a bomba de sódio e potássio encontra-se reduzida em pacientes bipolares maníacos e deprimidos (LOONEY AND EL-MALLAKH, 1997), confirma-se o potencial de validade de constructo do modelo animal de mania induzido por ouabaína.

A ouabaína é um fármaco já consolidado como indutor de um estado similar ao de mania em ratos, contudo, ainda não existe um protocolo para a indução de um estado de mania induzido por ouabaína em camundongos registrado na literatura. O uso de camundongos é mais viável para a maioria dos laboratórios, pois apresentam baixo custo de manutenção, são altamente prolíferos e não ocupam tanto espaço quanto os ratos. Também existem questões de economia de novos compostos e maior facilidade de manipulação, daí a importância de se padronizar um modelo experimental utilizando esse animal. Deste modo, o presente trabalho visa também

apresentar um modelo animal de mania alternativo aos já existentes, através da padronização do modelo de hiperatividade produzido pela disfunção da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , já empregado com sucesso em ratos, usando camundongos como sujeitos experimentais.

## **5 HIPÓTESE E OBJETIVOS:**

Este trabalho teve o objetivo de testar a hipótese de que a quercetina demonstre um potencial efeito antimaníaco quando avaliado em um modelo animal de mania, além de verificar se o modelo de hiperlocomoção induzido por ouabaína é reproduzível em camundongos, ou se trata de um modelo com efeito espécie-específico.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se o modelo animal de mania por hiperlocomoção induzida por ouabaína é reproduzível em camundongos;
- Verificar se a Risperidona, utilizada como controle positivo, exerce efeito sobre o comportamento de hiperlocomoção, a fim de validar o possível modelo animal;
- Verificar se a quercetina exerce efeito tipo antimaníaco quando administrada de forma aguda, antes da indução da hiperlocomoção pela ouabaína (pré-tratamento).

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos, pesando entre 30-40 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos em caixas de propileno (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. A autorização para a utilização de animais neste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPR.

### 6.2 DROGAS E TRATAMENTOS

- Risperidon (Risperidona 1 mg/kg) (Cristália, Brasil), via intraperitoneal (i.p.), empregado como controle positivo e diluído em água destilada;
- Quercetina (Sigma, EUA), nas doses de 10 e 40 mg/kg, via i.p., dissolvida em carboximetilcelulose (CMC) em solução de 0,3%.
- Ouabaína (Sigma, EUA) na concentração de  $10^{-4}$  Mm, via intracerebroventricular (i.c.v.), dissolvida em solução de 1% de Tween 80 e administrada em volume constante de 3 $\mu$ l.

Todos os fármacos via i.p. foram administrados em volume constante de 10 ml/kg de peso corporal. As doses propostas foram baseadas em estudos anteriores em nosso laboratório (SABIONI ET AL., 2008; PEREIRA ET AL., 2011) e em dados da literatura (BHUTADA ET AL., 2010). A sequência da administração dos fármacos e seus respectivos intervalos de tempo estão descritos na figura 4:

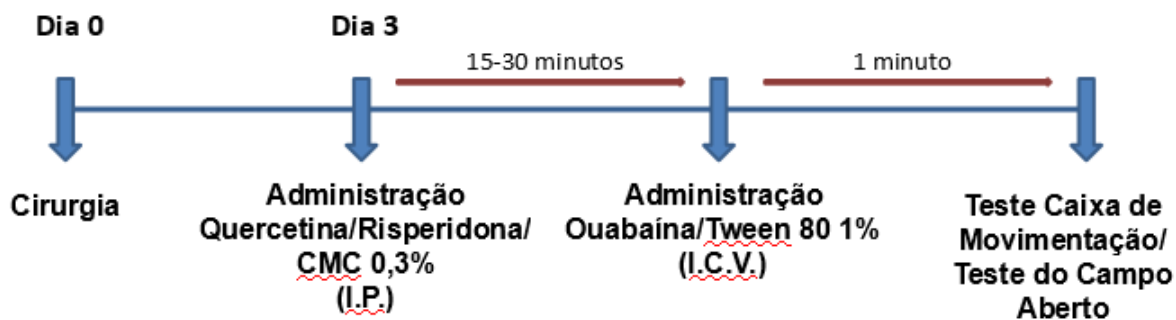


Figura 4: Linha do tempo do protocolo experimental.

## 6.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A divisão dos grupos controle e tratados foram distribuídos conforme a tabela 1:

TABELA 1: DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS CONFORME ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS

<b>GRUPO VEÍCULO (TWEEN 80)</b>	<b>GRUPO OUABAÍNA</b>
TWEEN 80 + CMC 3% (veículo)	OUABAÍNA + CMC 3% (veículo)
TWEEN 80 + QUERCETINA 10 mg/kg	OUABAÍNA + QUERCETINA 10 mg/kg
TWEEN 80 + QUERCETINA 40 mg/kg	OUABAÍNA + QUERCETINA 40 mg/kg
TWEEN 80 + RISPERIDONA 1 mg/kg	OUABAÍNA + RISPERIDONA 1 mg/kg

## 6.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) para a implantação de uma cânula-guia no

cérebro através do emprego de um aparelho estereotáxico. A pele da região craniana foi aberta para facilitar a visualização do bregma, que serviu de ponto de partida para a orientação das coordenadas. A cânula-guia de 10 mm foi implantada unilateralmente no ventrículo lateral (VL) de acordo com as seguintes coordenadas: AP -0.34 mm; ML +0,8 mm; DV -2.0 mm, a partir do bregma, com base nas coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2004), conforme a figura 5.



Figura 5: Visualização do bregma após a abertura da pele craniana do animal, fixado ao aparelho estereotáxico.

A cânula foi fixada com resina acrílica de uso odontológico e cianoacrilato (Super Bonder®). Todo o procedimento foi executado sob condições de higiene e o local da incisão foi tratado com peróxido de hidrogênio (água oxigenada 10 volumes).

#### 6.4 ADMINISTRAÇÃO DE OUABAÍNA E VEÍCULO

Para a administração de ouabaína os animais foram manualmente imobilizados e receberam as soluções pela via i.c.v. com o auxílio de uma agulha gengival, cujo comprimento excede em 2 mm a cânula-guia, ligada a um tubo de

polietileno, que por sua vez foi conectado a uma microseringa Hamilton<sup>®</sup>, através da cânula-guia anteriormente implantada (figura 6). As injeções i.c.v de ouabaína ( $10^{-4}M$  em um volume de 3 $\mu$ l) e veículo (Tween 80 solução 1%, em um volume de 3  $\mu$ l) foram administradas em intervalos de 3 a 5 dias após a cirurgia, tempo este necessário para a recuperação cirúrgica dos animais.



Figura 6: Imobilização manual do animal para introdução da cânula guia, anexada à seringa Hamilton<sup>®</sup> e à bomba de infusão.

## 6.5 TESTE DA CAIXA DE LOCOMOÇÃO

Os animais foram submetidos à caixa de locomoção, composta por paredes de madeira medindo 40x14x20 cm, a qual possui uma grade no chão e é equipada com 3 fotocélulas posicionadas a 2 cm do chão e espaçadas ao longo do eixo longitudinal, fechada na parte superior por uma tampa escura (figura 7). A atividade locomotora na caixa foi registrada durante 5 minutos por um contador digital acoplado às fotocélulas.



Figura 7: Caixa de movimentação, acoplada a um contador de cruzamento entre as fotocélulas internas.

## 6.6 TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD TEST)

O teste do campo aberto foi desenvolvido por Hall (1934) para o estudo do comportamento emocional (emocionalidade) em ratos. O termo emocionalidade foi utilizado por Hall para expressar o fato do animal ficar, por exemplo, imóvel quando exposto a um ambiente novo (LISTER, 1990). O equipamento original consiste de uma arena circular bem iluminada com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, circundada por uma parede circular de 0,45 m de altura. O procedimento de avaliação consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal), frequência de rearings, tempo de autolimpeza (grooming), defecação, tempo gasto para deixar a área central. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia (RAMOS et al., 1997; LISTER, 1990; PRUT et al., 2003). Em nosso experimento, avaliamos apenas a hiperlocomoção e a quantidade de cruzamentos nas demarcações da arena (figura 8).



Figura 8: Arena circular utilizada no Teste do Campo Aberto (Openfield Test).

#### 6.7 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DA CÂNULA-GUIA

Após a realização dos experimentos e antes da eutanásia, foi administrado via icv através da cânula-guia uma solução de azul de metileno, a fim de determinar se a cânula estava realmente implantada no ventrículo. Os animais que não apresentassem a marcação ventricular característica da técnica serão excluídos do experimento e posteriormente substituídos para completar o “n”. Todos os animais apresentaram a marcação ventricular, sendo validados para compor os dados experimentais, conforme observado na figura 9.

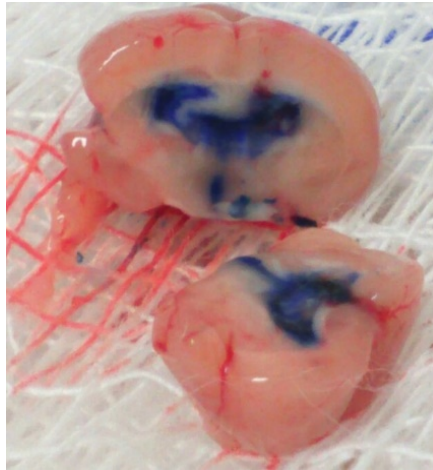


Figura 9: Verificação do local de implantação da cânula através da injeção icv de solução de azul de metileno. A marcação ventricular evidencia o local correto de implantação.

## 6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os experimentos, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls, exceto no experimento para comparação de camundongos operados e não operados (7.1), em que foi empregado o teste t de Student. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E DO VEÍCULO (TWEEN 80) NA LOCOMOÇÃO:

O resultado descrito na Figura 10 foi obtido através do teste da caixa de locomoção com animais sem qualquer tratamento (controle) e animais submetidos à

cirurgia estereotáxica para a implantação da cânula guia e injeção i.c.v. de solução de 1% de tween 80, a fim de avaliar se procedimento cirúrgico e o veículo utilizado na diluição da ouabaína interferiam diretamente na locomoção dos animais. 6 animais operados e 6 animais controle foram testados. De acordo com o gráfico, não foram observadas alterações significativas na locomoção dos animais após a cirurgia e após a administração do veículo via i.c.v., demonstrando que ambos não interferem na hiperlocomoção induzida pela ouabaína.

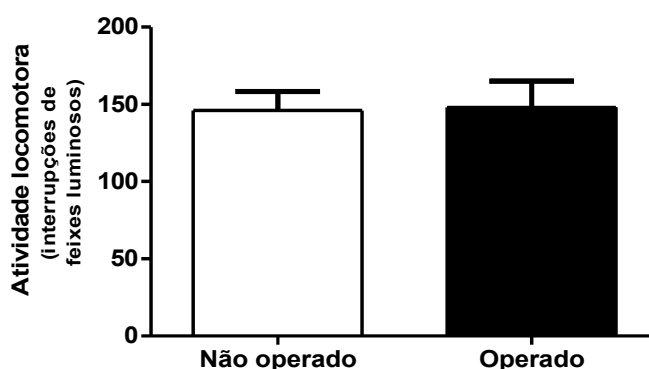


FIGURA 10: Ausência de interferência do procedimento cirúrgico e da administração do veículo (solução 1% de Tween 80) na locomoção dos animais, durante 5 minutos de exposição à caixa de movimentação, 3 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (n = 12).

## 7.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA NA HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA PELA OUABAÍNA:

Os resultados descritos na figura 11 demonstram o efeito da quercetina administrada via i.p. quando submetidos ao teste da caixa de movimentação. O tratamento com quercetina nas duas doses utilizadas foi capaz de bloquear o efeito hiperlocomotor da ouabaína, em doses que não alteram a locomoção *per se*, demonstrando seu efeito tipo antimaníaco quando administrada antes da injeção

i.c.v. de ouabaína. Importante ressaltar que este padrão comportamental foi também exibido pela risperidona, utilizada como controle positivo.

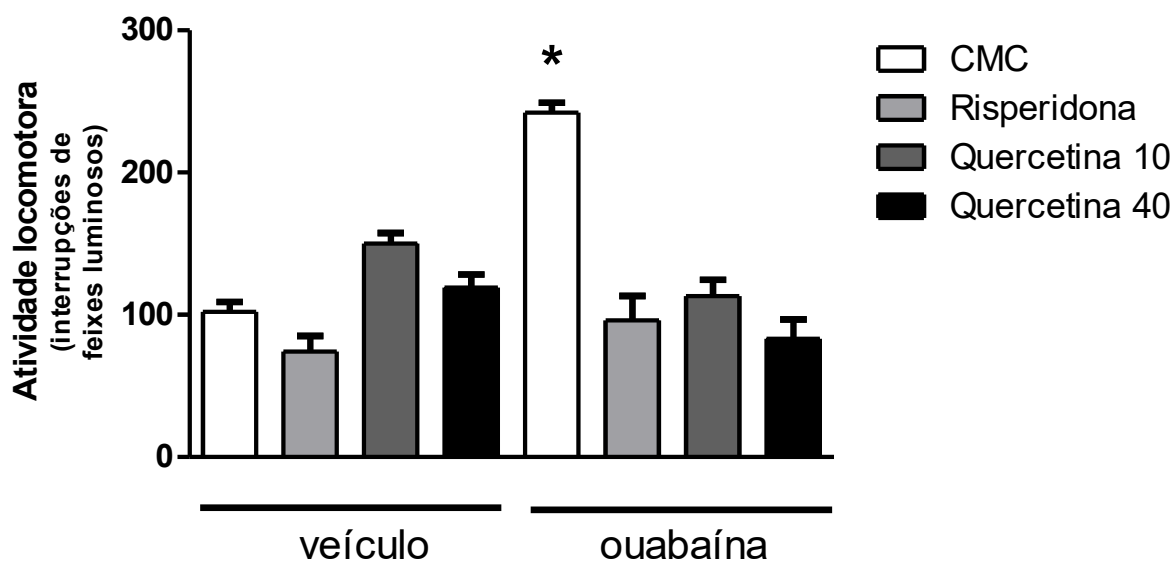


FIGURA 11: Efeito da administração aguda de quercetina via i.p. na atividade locomotora em camundongos submetidos à injeção i.c.v. de ouabaína no teste da caixa de locomoção. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 5). \*P < 0,05 quando comparado com o grupo controle.

Os resultados apresentados na figura 12 mostram o efeito da quercetina administrada via i.p. quando submetidos ao teste do campo aberto: a ouabaína induziu aumento da atividade locomotora e a risperidona reduziu a atividade geral (independente da administração de CMC 3% ou ouabaína).

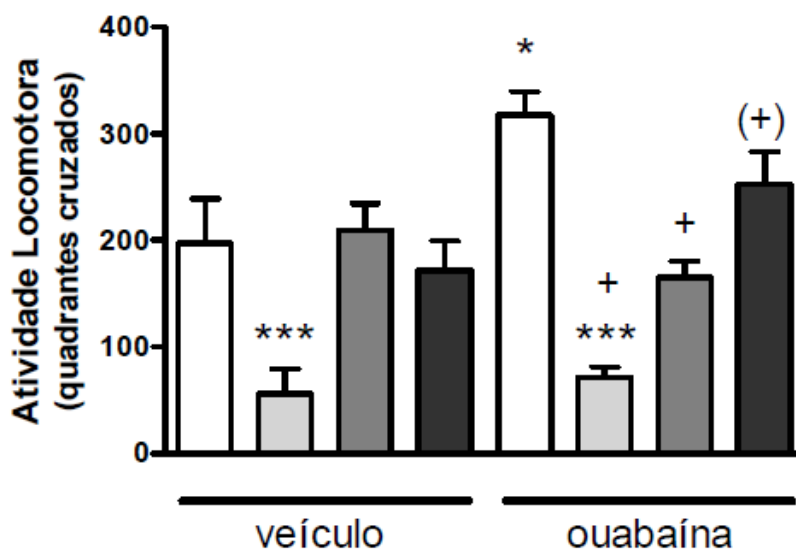


FIGURA 12: Efeito da administração aguda de quercetina via i.p. na atividade locomotora em camundongos submetidos à injeção i.c.v. de ouabaína. Foi observada indução de hiperlocomação após a administração da ouabaína via i.c.v. em relação ao grupo controle. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 5). +  $p < 0,05$  e (+)  $.10 > p > 0,5$  em relação à ouabaína + veículo;  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo veículo+veículo.

Os transtornos de humor que incluem a depressão unipolar e o transtorno bipolar são transtornos psiquiátricos que comprometem as funções fisiológicas, o humor e a cognição. A evolução dos transtornos de humor é flutuante, possuindo, em geral, uma característica de intervalos mais longos entre os episódios iniciais, com intervalos menores posteriores à medida que a doença progride. Os fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos de humor incluem a vulnerabilidade genética e os estressores psicossociais globais, que podem deflagrar conjuntamente a ocorrência de episódios completos (MACHADO-VIEIRA e SOARES, 2007).

Considerando a indicação através de estudos clínicos de que o estresse oxidativo e consequentemente a morte neuronal em determinadas estruturas cerebrais podem estar envolvidas na fisiopatologia dos transtornos de humor, e que a quercetina apresenta efeito neuroprotetor através de sua atividade antioxidante, este estudo investigou os efeitos deste flavonóide em um modelo animal de mania e seus mecanismos de ação.

Os resultados do presente estudo demonstram que a administração de quercetina produz um potencial efeito tipo antimaníaco em um modelo animal de mania, pois foi capaz de prevenir a hiperlocomoção ocasionada por ouabaína em camundongos. Este efeito antimaníaco da quercetina parece ser, ao menos em parte, devido a suas propriedades antioxidantes já descritas amplamente na literatura.

Além do efeito antimaníaco da quercetina, pudemos também observar que o modelo de hiperlocomoção induzida por ouabaína pode ser reproduzível em camundongos, considerando os resultados obtidos experimentalmente. A reversão da hiperlocomoção pela risperidona indica a sensibilidade do modelo às drogas antimaníacas. Entretanto, a risperidona também apresenta efeitos antipsicóticos e há necessidade de complementação com outras drogas antimaníacas que não possuem efeito antipsicótico (p.ex. lítio ou valproato de sódio). Os experimentos utilizando este modelo continuarão sendo realizados em nosso laboratório, a fim de confirmar a padronização e possibilidade de uso em outros trabalhos posteriormente.

## **8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- O modelo animal de hiperlocomoção induzida por ouabaína, amplamente utilizado em ratos, pode ser reproduzível também em camundongos;
- O efeito de hiperlocomoção não demonstrou ser provocado pelo procedimento cirúrgico, nem pela ação do veículo utilizado na dissolução da ouabaína;
- A quercetina produz efeito tipo antimaníaco específico quando administrada por via i.p. em um modelo animal de mania induzido por ouabaína.
- A quercetina foi capaz de reverter os efeitos comportamentais (hiperlocomoção) tanto no teste da caixa de locomoção quanto no teste do campo aberto, indicando um possível efeito neuroprotetor e antimaníaco deste flavonóide. Este parece ser dependente da prevenção da inibição da

bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e de suas propriedades antioxidantes. Além disso, seu efeito no modelo de mania empregado neste estudo é comparável ao exercido pelo lítio e pela risperidona, fármacos utilizados no tratamento do transtorno bipolar.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5ª edição. Washington, DC: American Pshychiatric Association, 2013.

ANDREATINI, Roberto. A importância dos modelos animais em psiquiatria. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 24, n. 4, p.164-164, 2 out. 2002.

ANDREAZZA, Ana C. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in bipolar disorder. **Eur. Psychiatry**, v.24, S15, 2009.

ANDREAZZA, Ana.C. et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. **J. Psychiatr. Res.**, v.41, p.523–529, 2007

ANDREAZZA, Ana C.; YOUNG, L. Trevor. The neurobiology of bipolar disorder: identifying targets for specific agents and synergies for combination treatment. **The International Journal Of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 07, p.1039-1052, 1 mar. 2013.

ARIKAN, Sedat et al. Quercetin protects the retina by reducing apoptosis due to ischemia-reperfusion injury in a rat model. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 78, n. 2, p.100-104, 2015.

ARMANI, F et al. Tamoxifen use for the management of mania: a review of current preclinical evidence. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 639-649, 2014.

BAI, O. et al. Expression of brain derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus after treatment with antipsychotic drugs. **J. Neurosci. Res.**, v.71, p.127–131, 2003

BARCELOS, Gustavo Rafael Mazzaron et al. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. **Archives Of Toxicology**, v. 85, n. 9, p.1151-1157, 1 fev. 2011.

BAXTER Jr., L.R. et al. Cerebral metabolic rates for glucose in mood disorders. Studies with positron emission tomography and fluorodeoxyglucose F-18. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 42, p.441–447, 1985.

BERTOLINO, Alessandro et al. Neuronal pathology in the hippocampal area of patients with bipolar disorder: a study with proton magnetic resonance spectroscopic imaging. **Biological Psychiatry**, v. 53, n. 10, p.906-913, maio 2003.

BERK, Michael et al.. Dopamine increases platelet intracellular calcium in bipolar affective disorder and controls. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v.9, p.291–293, 1994.

BERK, Michael et al. The specificity of platelet glutamate receptor supersensitivity in psychotic disorders. **Life Sci.**, v.66, p. 2427–2432, 2000.

BERK, Michael et al. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. **Acta Psychiatr. Scand. Suppl.**, p.41–49, 2007.

BERK, Michael et al. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p.346-351, jul. 2008.

BERK, Michael et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p.804-817, jan. 2011.

BOOTS, Agnes W.; HAENEN, Guido R.m.m.; BAST, Aalt. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal Of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p.325-337, maio 2008.

CALIYURT, O., ALTIAY, G.. Resting energy expenditure in manic episode. **Bipolar Disord.** v.11, p.102–106, 2009.

CHANG, Y.C. et al. Chronic administration of mood stabilizers upregulates BDNF and bcl-2 expression levels in rat frontal cortex. **Neurochem. Res.**, v.34, p.536–541, 2009

CHENG, R. et al. Genome-wide linkage scan in a large bipolar disorder sample from the National Institute of Mental Health genetics initiative suggests putative loci for bipolar disorder, psychosis, suicide, and panic disorder. **Mol. Psychiatry**, v.11, p.252–260.

CHENGAPPA, Kn Roy; GOODWIN, Guy M. Characterizing barriers, challenges and unmet needs in the management of bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 7, n. 1, p.5-7, abr. 2005.

CHUANG, De-maw et al. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. **Bipolar Disorders**, v. 4, n. 2, p.129-136, abr. 2002.

COUSINS, David; BUTTS, Kelly; YOUNG, Allan H. The role of dopamine in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 11, n. 8, p.787-806, dez. 2009.

CUI, J. et al. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. **Neuroscience**, v.144, p.1447–1453, 2007

EKMAN, Mattias et al. The societal cost of bipolar disorder in Sweden. **Social Psychiatry And Psychiatric Epidemiology**, [s.i], v. 48, p.1601-1610, out. 2013.

EREN, I., et al. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochem. Res.**, v.32, p.1188–1195, 2007

FATTAL, O. et al.. Psychiatric comorbidity in 36 adults with mitochondrial cytopathies. **CNS Spectr.** v.12, p.429–438, 2007.

FREY, Benicio N. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 31, n. 5, p.326-332, set. 2006.

FREY, Benício N. et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sciences**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.281-286, jun. 2006.

FREY, Benicio N et al. Biomarkers in bipolar disorder: A positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. **Australian & New Zealand Journal Of Psychiatry**, v. 47, n. 4, p.321-332, 14 fev. 2013.

GOODWIN, G.. Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder: revised second edition--recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal Of Psychopharmacology**, v. 23, n. 4, p.346-388, 27 mar. 2009.

GOULD, Thomas J; A KEITH, Rich; BHAT, Ratan V. Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine-induced open-field activity in two inbred strains of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 118, n. 1, p.95-105, jan. 2001.

GREEN, K. et al. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes 53 (Suppl. 1)**, S110–S118, 2004.

HASHIMOTO, Ryota et al. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: An essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p.1173-1179, dez. 2002.

HU, Pu et al. Quercetin relieves chronic lead exposure-induced impairment of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vivo. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, v. 378, n. 1, p.43-51, 6 maio 2008.

ISHISAKA, Akari et al. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 51, n. 7, p.1329-1336, out. 2011.

KAPCZINSKI, F. et al.. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.32, p.675–692, 2008.

KATO, T.. Mitochondrial dysfunction as the molecular basis of bipolar disorder: therapeutic implications. **CNS Drugs**, v. 21, p.1–11, 2007.

KARANTI, Alina et al. Changes in mood stabilizer prescription patterns in bipolar disorder. **Journal Of Affective Disorders**, v. 195, p.50-56, mai. 2016.

KANAZAWA, Luiz K.S. et al. Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 99, p.79-86, out. 2016.

KANAZAWA, Luiz K.S. et al. Effects of acute and chronic quercetin administration on methylphenidate-induced hyperlocomotion and oxidative stress. **Life Sciences**, v. 171, p.1-8, fev. 2017.

KELLY, Gregory S.. Quercetin.: Monography. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 2, p.172-194, jun. 2011.

KIM, Y.J. et al. Lamotrigine inhibition of rotenone- or 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial damage and cell death. **Brain Res. Bull.**, v.71, p.633–640, 2007.

KRAEPELIN, E.. Manic Depressive Insanity and Paranoia. **Thoemmes Press** , Bristol, 1921.

KONRADI, et al. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.61, p.300–308, 2004

LAKROUN, Zhoura et al. Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 22, n. 10, p.7776-7781, 28 fev. 2015.

LENAZ, G. et al. Mitochondrial bioenergetics in aging. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1459, p.397–404, 2000.

LI, X. Synaptic, intracellular, and neuroprotective mechanisms of anticonvulsants: are they relevant for the treatment and course of bipolar disorders?. **Journal Of Affective Disorders**, v. 69, n. 1-3, p.1-14, maio 2002.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. **Neurosci. Lett.**, v.421, p.33–36, 2007.

MAHADIK, S.P. et al. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.25, p.463–493, 2001.

MAINA, Giuseppe et al. Olanzapine or Lamotrigine Addition to Lithium in Remitted Bipolar Disorder Patients With Anxiety Disorder Comorbidity: A Randomized, Single-Blind, Pilot Study. **The Journal Of Clinical Psychiatry**, v. 69, p.609-616, abr. 2008.

MANJI, H K; CHEN, G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. **Molecular Psychiatry**, v. 7, p.46-56, jan. 2002.

MARTINOWICH, K. et al. New perspective of BDNF cell biology and its implications in depression. **Nat. Neurosci.**, v.10, 1089–1093, 2007

MAURER, I.C. et. al. Lithium-induced enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylation in human brain tissue. **Bipolar Disord.**, v.11, p. 515–522, 2009.

MERIKANGAS, Kathleen R. et al. Lifetime and 12-Month Prevalence of Bipolar Spectrum Disorder in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives Of General Psychiatry**, v. 64, n. 5, p.543-552, 1 maio 2007.

MERIKANGAS, Kathleen R. et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. **Archives Of General Psychiatry**, v. 68, p.241-251, mar. 2011.

OZCAN, M e et al. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 19, n. 2, p.89-95, mar. 2004.

PACCHIAROTTI, Isabella et al. The International Society for Bipolar Disorders (ISBD) Task Force Report on Antidepressant Use in Bipolar Disorders. **American Journal Of Psychiatry**, v. 170, n. 11, p.1249-1262, nov. 2013.

PHILLIPS, Mary L; KUPFER, David J. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions. **The Lancet**, v. 381, n. 9878, p.1663-1671, mai 2013.

POST, Robert M.. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am. J. Psychiatry**, v. 149, p. 999-1010, 1992.

POST, Robert M.. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 6, p.858-873, jan. 2007.

SABIONI, Pamela et al. The antimanic-like effect of tamoxifen: Behavioural comparison with other PKC-inhibiting and antiestrogenic drugs. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, v. 32, n. 8, p.1927-1931, dez. 2008.

SABOGAL-GUÁQUETA, Angélica Maria et al. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. **Neuropharmacology**, v. 93, p.134-145, jun. 2015.

SAMALIN, L.; NOURRY, A.; LLORCA, P.-m.. Lithium et anticonvulsivants dans la dépression bipolaire. **L'encéphale**, v. 37, p.203-208, dez. 2011.

STUCHEBRUKHOV, A.A.. Mechanisms of proton transfer in proteins: localized charge transfer versus delocalized soliton transfer. **Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.**, v.79, 031927, 2009.

SUN, X. et al. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. **J. Psychiatry Neuroscience**, v.31, p.189–196, 2006.

VALVASSORI, Samira S. et al. Contributions of animal models to the study of mood disorders. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 35, p.121-131, 2013.

VAN ENKHUIZEN, Jordy et al. Investigating the underlying mechanisms of aberrant behaviors in bipolar disorder from patients to models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 58, p.4-18, nov. 2015.

VAN ENKHUIZEN, Jordy et al. The catecholaminergic–cholinergic balance hypothesis of bipolar disorder revisited. **European Journal Of Pharmacology**, v. 753, p.114-126, abr. 2015.

WANG, J.F. et al. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. **Bipolar Disord.**, v.11, p.523–529, 2009.

YOUNG, Jared W; HENRY, Brook L; A GEYER, Mark. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. **British Journal Of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p.1263-1284, out. 2011.

ZARATE JUNIOR, Carlos A.; SINGH, Jaskaran; MANJI, Hussein K.. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. **Biological Psychiatry**, v. 59, p.1006-1020, 1 jun. 2006.

ZHANG, Yifan et al. Quercetin Promotes Neuronal and Behavioral Recovery by Suppressing Inflammatory Response and Apoptosis in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. **Neurochem Res.**, v. 40, n. 1, p.195-203, 28 dez. 2014.