



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CAMILA DANTAS MEDEIROS

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDA POR ANFETAMINA**

FORTALEZA/CE

2013

CAMILA DANTAS MEDEIROS

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDA POR ANFETAMINA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Farmacologia do Sistema Nervoso Central.

Orientador (a): Dr. André Ferrer Carvalho

FORTALEZA/CE

2013

CAMILA DANTAS MEDEIROS

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDA POR ANFETAMINA**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas

Aprovada:

BANCA EXAMINADORA

Dr. André Férrer Carvalho - UFC

Dr. Gilberto Sousa Alves – UFC

Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior – Unichristus

FORTALEZA/CE

2013

Dedico àqueles que sempre acreditaram na minha capacidade de vencer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, irmãos, tios, minha querida avó e meus amigos, esses que sempre torceram pelo meu sucesso. Agradeço também a todas as pessoas que me auxiliaram no laboratório, Marília, Thomás, Júnia, Patrícia, Vlória e, em destaque, a Rafaela Cordeiro. Considero esse experimento tanto meu quanto seu, obrigada!

Em especial, agradeço a minha co-orientadora e amiga, Danielle Macêdo, por ter feito esses anos de aprendizado prazerosos e por sempre ter acreditado na minha capacidade de ir mais longe. Obrigada também ao meu orientador André Ferrer pela oportunidade e acréscimo à minha vida profissional.

Por fim, agradeço ao CNPq e a CAPES por nos proporcionarem a chance de realizar essa pesquisa.

“Viver verdadeiramente é almejar grandes conquistas, querer o impossível, sonhar com o inimaginável e conseguir o que parecia inalcançável.”

(Camila Medeiros)

RESUMO

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno crônico, prevalente e associado a risco aumentado de suicídio. A fisiopatologia do TAB permanece incerta. Variados estudos apontam para o envolvimento do estresse oxidativo na neurobiologia do TAB. O ácido α -lipóico (AAL) vem sendo testado em diversas patologias do sistema nervoso central por possuir atividades antioxidantes diversas, como: quelante de metais, regenerador de antioxidantes endógenos e neutralizador de espécies reativas do oxigênio. O AAL apresentou efetividade e segurança em diversos ensaios pré-clínicos e clínicos de patologias associadas a danos oxidativos, como a neuropatia diabética e lesões de isquemia-reperfusão. Um dos modelos animais de mania aguda mais amplamente caracterizado é o da hiperatividade locomotora induzida por d-anfetamina (d-ANF). Trabalhos anteriores mostram que fármacos estabilizadores do humor, como lítio e valproato podem reverter e prevenir o aumento da atividade locomotora induzida por d-ANF. Diversas evidências demonstram que o TAB está associado a um aumento do estresse oxidativo. Como o AAL apresenta atividade antioxidante e não tinha sido estudado no TAB, o presente estudo objetivou testar os efeitos no AAL na reversão e prevenção da mania induzida por d-ANF em camundongos. No protocolo de reversão, camundongos adultos receberam primeiramente d-anfetamina (d-ANF) 2mg/kg, intraperitonealmente (i.p.) ou salina por 14 dias. Entre os dias 8 e 14, os animais receberam AAL a 50 ou 100 mg/kg oralmente, lítio (Li) 47,5 mg/kg i.p., ou salina. No protocolo de prevenção, os camundongos foram pré-tratados com AAL, Li ou salina antes da administração de d-ANF. A atividade locomotora foi avaliada com o teste comportamental campo aberto. A atividade da superóxido dismutase (SOD), os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliados no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE). Em adição, os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foram mensurados no HC. O AAL e o Li preveniram e reverteram o aumento da atividade locomotora induzida pela d-ANF. No modelo de prevenção, o AAL e o Li quando coadministrados com d-ANF preveniram o aumento da atividade da SOD induzida pela d-ANF no HC e CE, respectivamente; o AAL e o Li preveniram a alteração do GSH no HC e a formação de TBARS em todas as áreas do cérebro estudadas. No modelo de reversão, o AAL reverteu a diminuição da atividade da SOD no CE. A formação de TBARS foi revertida pelo AAL e o Li em todas as áreas cerebrais mencionadas. Adicionalmente, o AAL reverteu a diminuição dos níveis de BDNF e GSH no HC. Conclusivamente, os resultados apresentados demonstraram que o AAL, similarmente ao Li, é efetivo em reverter e prevenir alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela d-ANF, fornecendo base para o desenvolvimento de ensaios clínicos que investiguem o possível efeito antimaníaco do AAL.

Palavras-chave: ácido α -lipóico, d-anfetamina, mania, modelo animal, estresse oxidativo, BDNF.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a chronic disorder, prevalent and associated with increased risk of suicide. The pathophysiology of BD remains uncertain. Several studies point to the involvement of oxidative stress in its neurobiology. The α -lipoic acid (AAL) has been tested in several pathologies of the central nervous system once it has different antioxidant activities, such as: metal chelator, regenerating endogenous antioxidants and neutralizing reactive oxygen species. The AAL showed effectiveness and safety in various preclinical and clinical studies with diseases associated with oxidative damage, such as diabetic neuropathy and ischemia-reperfusion. One of the animal models of acute mania that is best characterized nowadays is the locomotor hyperactivity induced by d-amphetamine (d-ANF). Previous studies show that mood stabilizers such as lithium and valproate can reverse and prevent the increase in locomotor activity induced by d-ANF. Many evidences show that BD is associated with increased oxidative stress. As AAL has antioxidant activity and had not been studied in BD yet, the present study aimed to test the effects of AAL in the reversal and prevention of mania induced by d-ANF in mice. In the reversal protocol, adult mice first received d-amphetamine (d-ANF) 2mg/kg intraperitoneally (i.p.) or saline for 14 days. Between day 8 and 14 animals received AAL 50 or 100 mg / kg orally, lithium (Li) 47.5 mg / kg i.p. or saline. In the prevention protocol, mice were pretreated with AAL, Li or saline before administration of d-ANF. The locomotor activity was assessed using the open field behavioral test. The activity of superoxide dismutase (SOD), the levels of reduced glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) were evaluated in the prefrontal cortex (CPF), hippocampus (HC) and striatum (CE). In addition, the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were measured in the HC. AAL and Li prevented and reversed the increase in locomotor activity induced by d-ANF. In the prevention model, the AAL and Li when co-administered with d-ANF prevented the increase of SOD activity induced by d-ANF in HC and CE, respectively; AAL and Li prevented the alteration of GSH levels in HC and TBARS formation in all brain areas investigated. In the reversal model, AAL reversed the decrease in SOD activity in CE. The formation of TBARS was reversed by AAL and Li in all brain areas mentioned. Additionally, AAL reversed the decreased levels of BDNF and GSH in HC. Conclusively, the results showed that the AAL, similarly to Li, is effective in reversing and preventing behavioral and neurochemical changes induced by d-ANF, providing the basis for the development of clinical trials to investigate the AAL's possible antimanic effects.

Key-words: α -lipoic acid, d-amphetamine, animal model, mania, oxidative stress, BDNF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

μl – microlitro

μM – micromolar

°C – grau Celsius

AL – ácido lipóico

AAL – ácido α-lipóico

AC – adenilil ciclase

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

APA – *American Psychiatric Association*

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

CAD – catalase

CE – corpo estriado

CEPA – Comitê de Ética de Pesquisa Animal

cm – centímetro

CMC – carboxil metil celulose

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPF – córtex pré-frontal

DA – dopamina

d-ANF – d-anfetamina

DHLA – ácido dihidrolipóico

DL₅₀ – dose letal mediana

DNA – ácido desoxirribonucleico

DRD2 – receptor de dopamina D2

DTNB – ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

ECA – Epidemiologic Catchment Area Study

EDTA – ácido tetra acético etilenodiamina

ERO – espécie reativa de oxigênio

Fe²⁺ - ferro 2+

g – grama

GPx – glutationa peroxidase

GSH – glutationa reduzida

GSK3 – glicogênio sintase quinase 3

h – hora

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HC – hipocampo

i.p. – intraperitoneal

Kg – quilograma

L-dopa – L-3,4-dihidroxitifenilalanina

Li – lítio

MAO – monoamina oxidase

MDA – malonildialdeído

mg – miligrama

MHPG – 3-metoxi-4-hidroxitifenilmetil-glicol

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

NADPH – fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NBT – nitro-blue-tetrazólio

NCS – *National Comorbidity Survey*

ng – nanograma

nm – nanômetro

nM – nanomolar

NO - nitrito

pH – potencial hidrogeniônico

PKC – proteína quinase C

PLC – fosfolipase C

rpm – rotação por minuto

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TAB – Transtorno afetivo bipolar

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TODA – transportador de dopamina

Trk B – tirosina quinase B

W – watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias dopaminérgicas -----	18
Figura 2: Córtex frontal -----	20
Figura 3: Sistema de segundos-mensageiros -----	22
Figura 4: Mecanismos antioxidantes celulares -----	23
Figura 5: Mecanismo de ação da anfetamina -----	28
Figura 6: Estrutura molecular do AL e sua forma reduzida (DHLA) -----	33
Figura 7: Atividades antioxidantes do AL e/ou DHLA -----	34
Figura 8: Planejamento Experimental -----	40
Figura 9: Campo aberto -----	41
Figura 10: Número de <i>crossings</i> e <i>rearings</i> apresentados no teste de campo aberto após os protocolos de reversão (A) e prevenção (B) -----	45
Figura 11: Atividade da SOD, níveis de GSH e MDA no CPF, HC e CE após o protocolo de prevenção -----	47
Figura 12: Atividade da SOD, níveis de GSH e MDA no CPF, HC e CE após o protocolo de reversão -----	49
Figura 13: Níveis de BDNF no HC após os protocolos de prevenção (A) e reversão (B) -----	50
Figura 14: Síntese dos resultados apresentados no protocolo de reversão -----	51
Figura 15: Síntese dos resultados apresentados no protocolo de prevenção -----	52
Figura 16: Metabolismo da dopamina -----	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estágios e sintomas da mania -----	17
Tabela 2: Recomendações para o tratamento farmacológico da mania aguda -----	29
Tabela 3: Recomendações para o tratamento farmacológico da depressão aguda do TAB tipo I -----	30
Tabela 4: Recomendações para o tratamento farmacológico da depressão aguda do TAB tipo II -----	30
Tabela 5: Recomendações para a manutenção da farmacoterapia do TAB -----	31
Tabela 6: Recomendações para a manutenção da farmacoterapia do TAB tipo II -----	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR	16
1.1.1 Etiologia do TAB	17
1.1.1.1 Alterações nos sistemas de monoaminas	17
1.1.1.2 Alterações anatômicas e funcionais	19
1.1.1.3 Alterações nos sistemas de segundos-mensageiros	21
1.1.2 O estresse oxidativo no TAB	22
1.1.3 O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no TAB	24
1.1.4 Modelos animais de mania	25
1.1.5 Tratamento do TAB	28
1.2 ÁCIDO LIPÓICO	32
1.3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 METODOLOGIA	39
3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	39
3.1.1 Animais	39
3.1.2 Drogas utilizadas	39
3.1.3 Planejamento experimental	39
3.1.4 Teste comportamental (campo aberto)	40

3.1.5 Determinações bioquímicas -----	41
3.1.5.1 Determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) -----	41
3.1.5.2 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) -----	42
3.1.5.3 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de MDA) -----	42
3.1.5.4 Determinação dos níveis de BDNF -----	43
3.1.6 Análise estatística -----	43
4 RESULTADOS -----	44
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS COM MANIA INDUZIDA POR D-ANF E TRATADOS COM AAL -----	44
4.2 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO -----	46
4.2.1 Protocolo de prevenção -----	46
4.2.2 Protocolo de reversão -----	48
4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF NO HIPOCAMPO -----	50
4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS APRESENTADOS -----	51
5 DISCUSSÃO -----	53
6 CONCLUSÃO -----	59
7 REFERÊNCIAS -----	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é uma condição psiquiátrica severa e crônica, anteriormente conhecida como distúrbio maníaco-depressivo. Os pacientes bipolares apresentam uma alternância de humor incomum, o que acaba por afetar relacionamentos e atividades diárias simples, piorando a qualidade de vida tanto deste quanto de seus familiares. Acredita-se que, mundialmente, o risco de uma pessoa apresentar TAB durante a vida é de aproximadamente 1%, no entanto Kessler e colaboradores (KESSLER *et al.*, 2005), apresentaram em estudo recente que esse risco pode ser de até 4% quando se considera formas mais brandas do TAB. Em pesquisas realizadas na comunidade americana, *Epidemiologic Catchment Area Study (ECA)* e *National Comorbidity Survey (NCS)* (KESSLER *et al.*, 1994), as estimativas de prevalência de TAB na população são em média de 0,8 e 1,6% respectivamente, não havendo diferença significativa entre homens e mulheres. Para os que apresentam o transtorno, o risco de suicídio é de 20% (GOLDBERG; HARROW, 2004) o que faz com que o mesmo seja considerado grave e de tratamento necessário.

A Associação Psiquiátrica Americana (*American Psychiatric Association - APA*) admite a existência de vários subtipos de transtorno bipolar – entre eles o tipo I, II e o ciclotímico, que se encaixa dentro do grande grupo de espectro bipolar -, sendo essa classificação feita a partir da observação da ocorrência de quadros depressivos, maníacos e/ou hipomaníacos (MILLER *et al.*, 2009). O quadro depressivo é caracterizado por autoestima baixa, indisposição, tristeza, falta de atenção, desprazer e alterações de sono/apetite. Já o episódio maníaco é evidenciado principalmente pela euforia, hiperatividade, insônia, comportamentos extravagantes e otimismo excessivo a ponto de prejudicar o julgamento do paciente (BELMAKER, 2004). A hipomania, por sua vez, assemelha-se à mania de uma forma mais branda (MILLER *et al.*, 2009). Na figura seguinte, temos uma adaptação da tabela do livro “Transtorno Bipolar: Teoria e clínica” (KAPCZINSKI *et al.*, 2009) onde estão representados os estágios da mania e seus respectivos sintomas:

Tabela 1 – Estágios e sintomas da mania

Estágios da mania			
Sintomas	Estágio I	Estágio II	Estágio III
Humor	Labilidade afetiva, euforia, irritabilidade	Disforia e depressão, intensa hostilidade e manifestações de raiva	Disforia, sentimentos de pânico e desesperança
Cognição	Expansividade, grandiosidade, autoconfiança exagerada, pensamentos coerentes, no entanto rápidos e tangenciais, aumento de interesse em temas sexuais ou religiosos	Fuga de ideias, desorganização cognitiva, delírios	Pensamento incoerente, delírios bizarros, ideias de auto-referência, alucinações, desorientação temporoespacial
Comportamento	Ativ. psicomotora aumentada, pressão de discurso, aumento dos gastos, vícios	Aceleração psicomotora, logorréia, comportamento explosivo	Ativ. psicomotora frenética e frequentemente bizarra

Adaptação da tabela do livro “Transtorno Bipolar: Teoria e Clínica” (KAPCZINSKI *et al.*, 2009) representando os estágios de mania e seus respectivos sintomas.

1.1.1. Etiologia do TAB

Embora o TAB seja um assunto de frequente estudo científico recentemente, as suas causas neurofisiológicas permanecem incertas. No entanto, existem pesquisas que indicam alterações tanto anatômicas quanto fisiológicas em pacientes bipolares.

1.1.1.1 Alterações nos sistemas de monoaminas

Sabe-se que pacientes depressivos apresentam baixos níveis de aminas biogênicas: noradrenalina, serotonina e dopamina. Esses neurotransmissores atuam, dentre outros, no sistema límbico, modulando funções endócrinas, o ciclo sono-vigília, o apetite e, finalmente, os estados comportamentais. Os antidepressivos, portanto, atuam regulando a excitabilidade neuronal e a disponibilidade dessas aminas. Alterações na regulação dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico foram sugeridas estarem envolvidas no TAB

uma vez que pesquisadores observaram que alguns pacientes bipolares depressivos quando tratados com antidepressivos, especialmente tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase (MAO), alternavam seu quadro depressivo para o maníaco (BOTTLENDER *et al.*, 1998).

O sistema dopaminérgico é descrito como sendo um dos principais envolvidos na fisiopatologia da mania do TAB, uma vez que várias de suas funções estão relacionadas com a sintomatologia desse quadro. Atualmente, existem quatro vias dopaminérgicas principais descritas (Figura 1): 1 - Nigro-estriatal (controle de funções motoras); 2 - Mesocortical (funções neurocognitivas); 3 - Mesolímbica (controle de prazer e motivação); 4 - Tuberoinfundibular (secreção de prolactina) (VALLONE *et al.*, 2000).

Figura 1: Vias dopaminérgicas

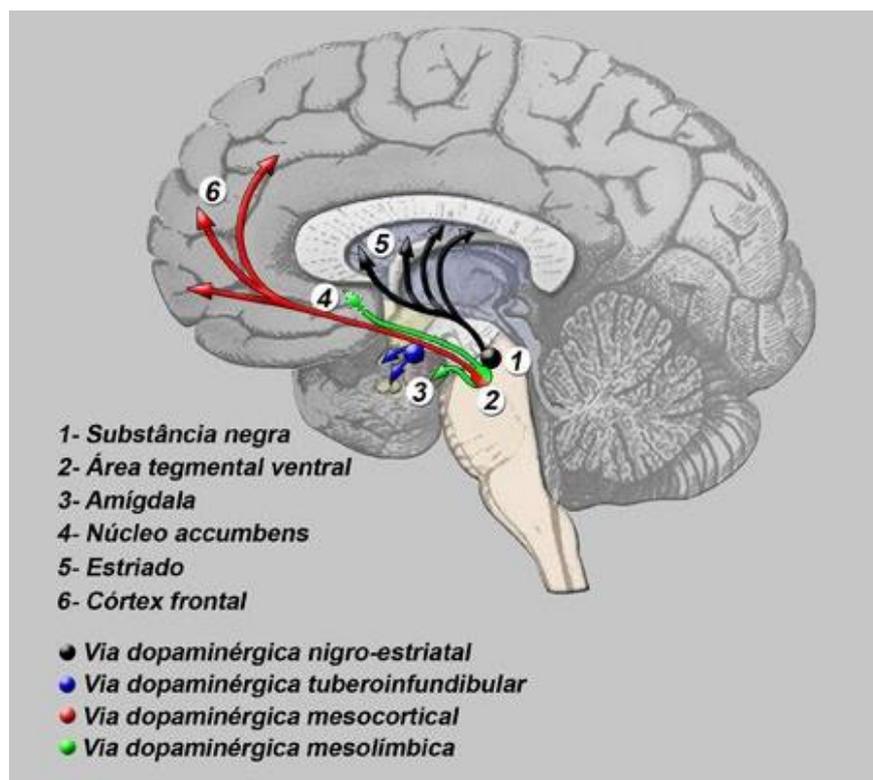


Ilustração das vias dopaminérgicas e suas respectivas áreas cerebrais envolvidas.

(Fonte: <http://oneurotransmissor.blogspot.com.br/2013/05/patologias-causas-esquizofrenia.html>)

Portanto, devido a suas respectivas funções, vários sintomas de humor, cognição e comportamento (ex.: aumento da atividade psicomotora) descritos na tabela 1 estariam

relacionados com a hiperatividade deste sistema. Uma relação entre o sistema dopaminérgico e o TAB foi definitivamente estabelecida uma vez que substâncias psicoestimulantes (anfetamina e a cocaína) e a L-dopa (precursor da dopamina utilizado no tratamento da doença de Parkinson), que atuam de forma a aumentar a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, podem induzir o estado maníaco em pacientes bipolares ou pessoas que tenham predisposição para tal (ACKENHEIL, 2001).

O sistema serotoninérgico é sugerido ser o responsável pelos sintomas de tentativas e ideias de suicídio, agressividade, impulsividade e sono conturbado encontrados nos pacientes, uma vez que esse neurotransmissor está normalmente envolvido em funções centrais como sono, apetite e controle de impulso (ACKENHEIL, 2001). Pesquisas também apontam uma possível relação entre anormalidades em genes desse sistema e o transtorno afetivo bipolar (KUNUGI *et al.*, 1997).

Do mesmo modo, pesquisadores encontraram evidências de que pacientes em quadro de mania apresentam níveis aumentados de 3-metoxi-4-hidroxifenilmetil-glicol (MHPG), metabólito da noradrenalina (SWANN *et al.*, 1983). Quando os mesmos são tratados com lítio, apresentam uma baixa significativa nesses indicadores (SWANN *et al.*, 1987). Em contrapartida, no estado depressivo, observou-se que o funcionamento do sistema noradrenérgico encontra-se diminuído uma vez que baixas concentrações desse metabólito foram evidenciadas (EDWARDS *et al.*, 1980).

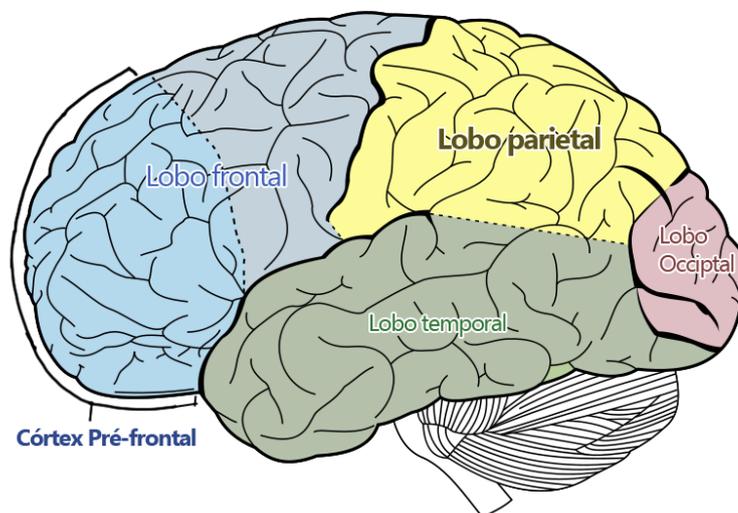
1.1.1.2 Alterações anatômicas e funcionais

Alterações anatômicas e funcionais também foram encontradas em áreas cerebrais específicas de pacientes bipolares, principalmente no córtex frontal. Essa área é a região cerebral a qual é limitada posteriormente pelo sulco central (Figura 2), contendo as seguintes subdivisões: motora, pré-motora e o córtex pré-frontal, podendo o córtex cingulado anterior também ser considerado participante do mesmo. Nesse lobo encontram-se cinco circuitos: um motor, um oculomotor e três outros com funções cognitivas e afetivas. De uma maneira geral, o córtex frontal possui papel importante em processos cognitivos como funções de planejamento e execução, atenção, memória e linguagem. Essas, por sua vez, afetam humor,

personalidade, percepção pessoal bem como a racionalização social e moral (CHAYER; FREEDMAN, 2001).

No TAB, estudos de neuroimagem demonstraram uma diminuição neuronal e glial em regiões do córtex frontal (RAJKOWSKA *et al.*, 2001), de fluxo sanguíneo no córtex pré-frontal subgenual (DREVETS *et al.*, 1997), bem como a existência de hipometabolismo nas áreas frontais e subcorticais (BEARDEN *et al.*, 2001).

Figura 2 – Córtex frontal



Representação dos lobos cerebrais, ressaltando especificamente o lobo frontal, área encontrada afetada em pacientes bipolares.

(Fonte: <http://neuropsicopedagogianasaladeaula.blogspot.com.br/2012/11/voce-consegue-guardar-segredos.html>)

Em outra perspectiva de abordagem, Kapczinski *et al* (2008) associa o TAB a uma elevação patológica da carga alostática, termo que se refere à decorrência do esforço do organismo para adaptar seus parâmetros internos à diferentes situações em prol de manter sua função normal. No caso do TAB, os mesmos genes envolvidos neste transtorno estão vinculados a uma maior predisposição ao estresse, o que aumenta a carga alostática, causando comprometimento cognitivo e aumento das taxas de co-morbidades físicas e psiquiátricas (KAPCZINSKI *et al.*, 2008b).

1.1.1.3 Alterações nos sistemas de segundos-mensageiros

A maioria dos neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC) tem seu receptor pós-sináptico ligado às proteínas G. Essas, por sua vez, tem a função de transmitir o sinal para o meio intracelular e dar início a uma reação em cascata incluindo três principais sistemas de segundos-mensageiros: adenilil ciclase (AC), fosfolipase C (PLC) e canais de íons. Os produtos desses sistemas, como adenosina monofosfato cíclica (AMPc), fosfato inositol, diacilglicerol e o cálcio, atuam em diferentes proteínas quinases que levam a expressão gênica de enzimas, receptores e transportadores, esses que regulam a atividade neuronal (Figura 3) . Em pacientes bipolares maníacos, foi observado um aumento no conteúdo de proteína quinase C (PKC) (HAHN *et al.*, 2005) e no nível de cálcio intracelular (DUBOVSKY *et al.*, 1989), o que resulta no aumento da excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores. Além dessas evidências, crê-se que esses sistemas estão intimamente envolvidos na patologia do TAB uma vez que estabilizantes de humor, como o valproato e o lítio, possuem seus mecanismos de ação ligados aos mesmos.

Figura 3 – Sistemas de segundos-mensageiros

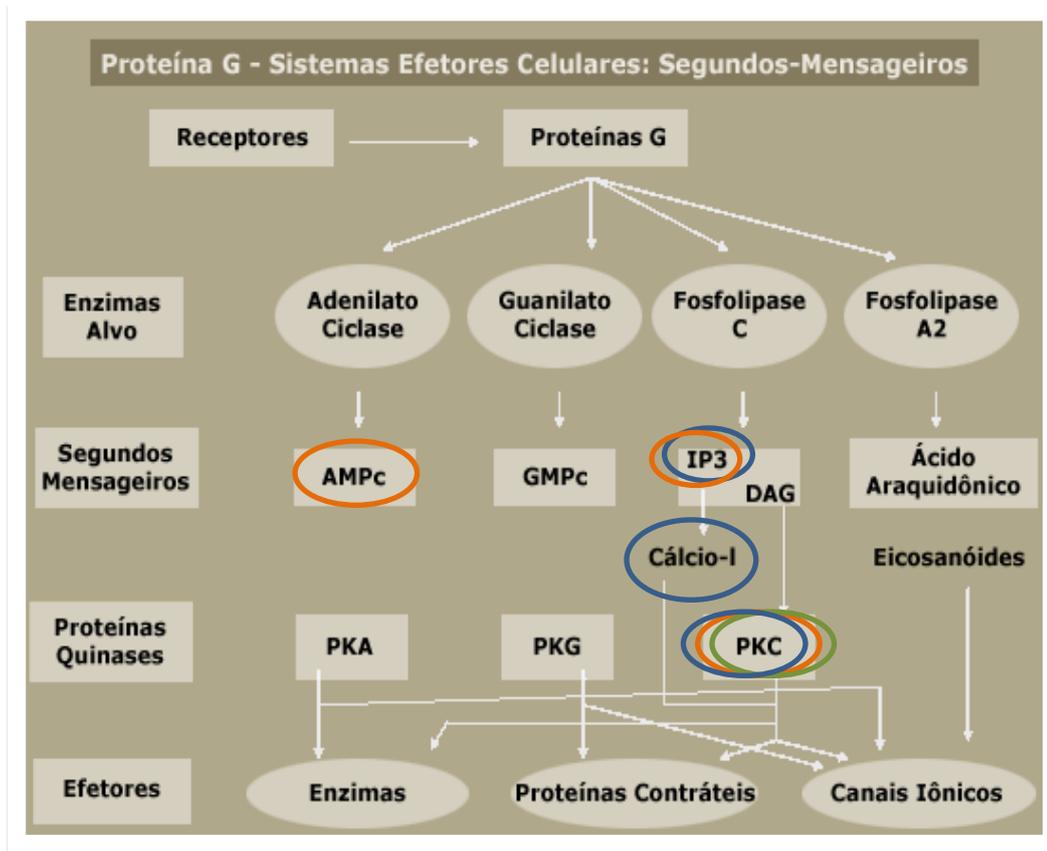


Ilustração representando os sistemas de segundos-mensageiros envolvidos no mecanismo de ação das proteínas G. Em laranja, pontua-se onde foi observado que o lítio atua; em verde, o valproato e, por fim, em azul, os fatores encontrados alterados no TAB.

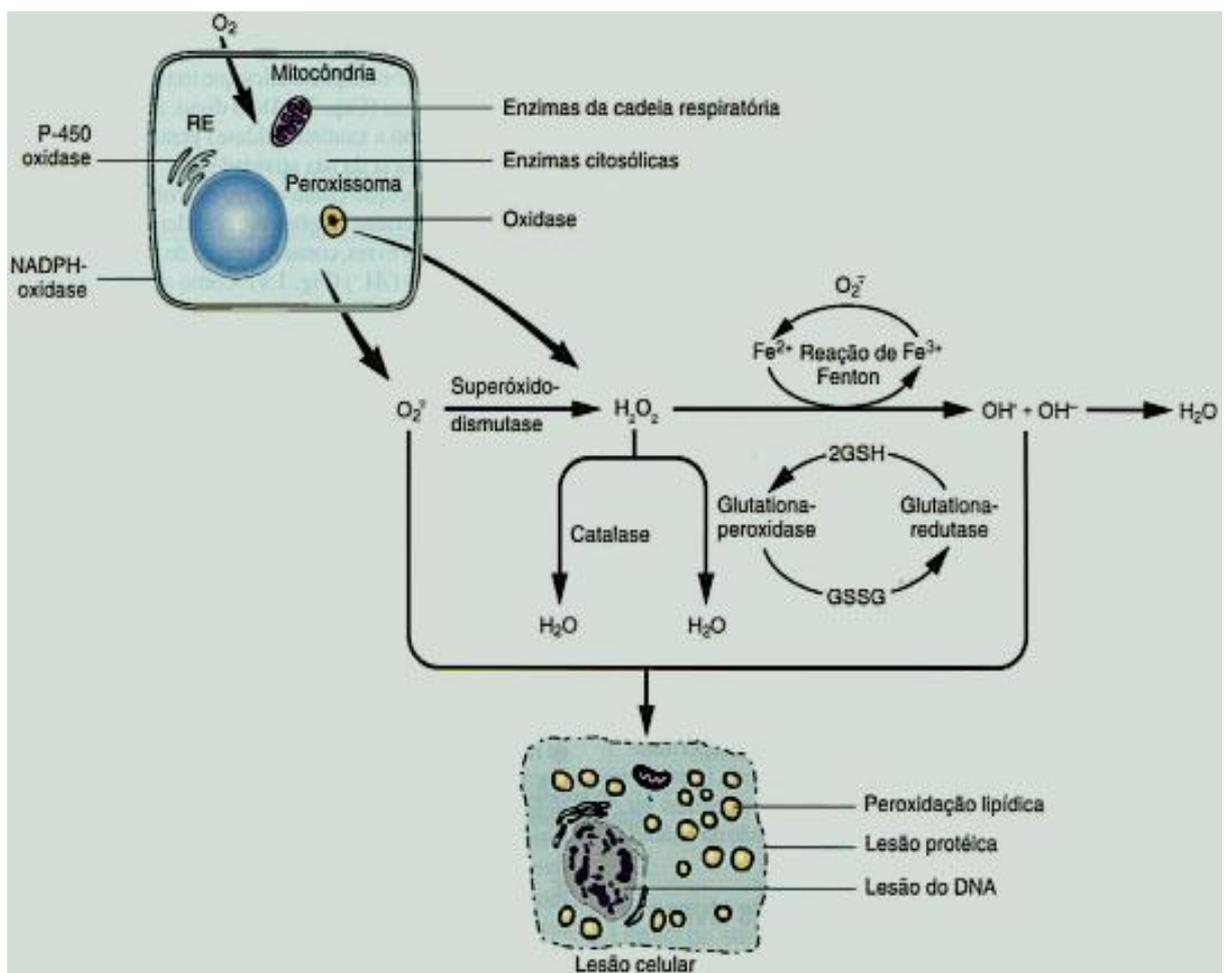
(Fonte: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia_id=47&materiaver=1 – versão adaptada)

1.1.2. O estresse oxidativo no TAB

Processos oxidativos biológicos essenciais, como a fosforilação oxidativa encarregada de gerar energia celular, são responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), compostos que possuem elétrons desemparelhados, bastante reativos e capazes de causarem danos à célula. Como uma maneira de se proteger, a célula possui mecanismos antioxidantes que podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos, dependendo da sua estrutura e forma de ação. Entre as enzimas antioxidantes, temos como exemplo a superóxido dismutase (SOD) que atua transformando ânions radicais superóxidos em

peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx) que agem sobre o peróxido de hidrogênio transformando-o em água e oxigênio. Entre os antioxidantes não-enzimáticos, podemos citar a glutaciona (GSH) que atua em conjunto com a enzima GPx, a vitamina C que possui ação de “*scavenger*” (transforma radicais livres em formas menos reativas) e de restaurar a vitamina E, e a própria vitamina E que atua nas membranas plasmáticas devido ao seu caráter lipofílico. O estresse oxidativo ocorre quando se estabelece um desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade da célula de eliminá-las através de seus mecanismos antioxidantes. Esse desequilíbrio pode ser alcançado quando a produção de EROs é aumentada bruscamente ou quando os mecanismos antioxidantes celulares não funcionam corretamente ou o suficiente. Uma vez atingido, segue um aumento na destruição de biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos pelas EROs o que, eventualmente, pode levar a morte celular (BIEWENGA *et al.*, 1997) (Figura 4).

Figura 4 – Mecanismos antioxidantes celulares



Representação dos mecanismos antioxidantes celulares. (Fonte: <http://www.sistemanervoso.com>)

Esse mecanismo é indicado como sendo presente em várias fisiopatologias importantes como isquemia-reperfusão, doenças neurodegenerativas, neuropatia diabética e erros inatos do metabolismo (PACKER *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2004). Através de estudos recentes, uma relação entre estresse oxidativo e TAB também está sendo estabelecida.

Um grupo de pesquisa induziu estresse oxidativo com anfetamina em animais e, posteriormente, trataram-nos com lítio e valproato (estabilizantes de humor). Ambos os medicamentos reverteram o aumento da peroxidação lipídica no pré-frontal, bem como a preveniram no hipocampo (FREY *et al.*, 2006d). O mesmo grupo de pesquisadores observou que gêmeas idênticas bipolares antes de serem tratadas apresentavam índices mais altos de SOD e malonildialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, e mais baixos de atividade da CAT que os dos controles. Após um período, a gêmea que havia sido tratada com estabilizantes de humor, apresentou índices similares ao dos sujeitos controles enquanto a que não havia sido tratada manteve seus índices alterados. Esses resultados sugerem que esses índices podem ser normalizados através de tratamento farmacológico bem como o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiologia do TAB (FREY *et al.*, 2007a).

Outros pesquisadores demonstraram também que indicadores de estresse oxidativo como a peroxidação lipídica, a atividade da SOD, CAT, GPx e/ou dano ao DNA foram encontrados alterados em pacientes bipolares (FREY *et al.*, 2007a; KULOGLU *et al.*, 2002; RANJEKAR *et al.*, 2003).

Um artigo de revisão escrito por Andrezza e colaboradores demonstrou uma análise de trabalhos já publicados em prol de indicar os possíveis marcadores de estresse oxidativo encontrados no TAB. Os resultados obtidos foram que os níveis de substâncias reativas ao ácido tio barbitúrico (TBARS) e nitrito (NO) são significativamente maiores em pacientes bipolares, enquanto os níveis de atividade da SOD, CAD e GPx não pareciam estar significativamente alterados nesses pacientes (ANDREAZZA *et al.*, 2008a).

1.1.3. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no TAB

O BDNF é um membro da família dos fatores de crescimento denominada genericamente de “neurotrofinas”, cujos efeitos resultam da ativação do seu receptor tirosina-

quinase B (Trk B) (DUMAN, 2002). O BDNF tem influência marcante na eficácia sináptica, na conectividade neuronal e na neuroplasticidade (POST, 2007a). O mesmo está expresso principalmente no córtex cerebral e no hipocampo, áreas cerebrais que regulam funções cerebrais complexas, como a memória declarativa e a emoção (GRANDE *et al.*, 2010). A expressão do BDNF é regulada por corticosteróides relacionados ao estresse e tal interação parece influenciar a vulnerabilidade à psicopatologia moderada por estressores ambientais, dentre elas o TAB (KAUER-SANT'ANNA *et al.*, 2007; MANJI *et al.*, 2003). Os níveis de BDNF têm influência sobre o volume hipocampal (GRANDE *et al.*, 2010); por exemplo, mulheres deprimidas com histórico de abuso sexual têm um o mesmo 18% menor que mulheres que não sofreram abuso sexual (VYTHILINGAM *et al.*, 2002). Dessa forma, o BDNF pode mediar os efeitos do estresse psicossocial no TAB e a disfunção cognitiva comumente relacionada a episódios afetivos repetidos (BERK *et al.*, 2011a; POST; WEISS, 1997).

Frey *et al.* (2006), após tratar animais com anfetamina, observou que os níveis de BDNF dos mesmos encontravam-se diminuídos. Entretanto, o tratamento com lítio aumentou os níveis de BDNF no hipocampo dos animais quando administrado antes (tratamento de prevenção) e depois da anfetamina. Já o valproato elevou os níveis hipocampais de BDNF quando administrado depois da anfetamina (tratamento de reversão). Portanto, é possível que o BDNF seja uma molécula relevante para a compreensão dos mecanismos de ação de fármacos com a atividade antimaníaca (FREY *et al.*, 2006a). Curiosamente, um estudo recente sugeriu que na mania há uma correlação negativa entre peroxidação lipídica (TBARS) e níveis séricos de BDNF (KAPCZINSKI *et al.*, 2008a).

Uma metanálise recente sugere que o BDNF possa ser um marcador de estado do TAB, tendo-se seus níveis diminuídos durante os quadros de mania e depressão (FERNANDES *et al.*, 2011). Adicionalmente, o mesmo estudo revelou que o tratamento farmacológico da mania aguda eleva os níveis do BDNF.

1.1.4. Modelos animais de mania

O conhecimento das alterações fisiológicas causadas pelas patologias bem como a compreensão da eficácia e de mecanismos de ação de fármacos permitem que modelos

animais sejam desenvolvidos. Os mesmos são importantes na pesquisa uma vez que auxiliam no teste e na criação de novas hipóteses, bem como facilitam a inferência de futuros resultados de testes em humanos.

Para que um modelo animal seja reconhecido pela comunidade científica, é necessário que o mesmo seja validado em três critérios: a) aparente; b) preditivo ou farmacológico; c) de constructo ou etiológico. Ou seja, o modelo animal deve mimetizar nos animais importantes características anatômicas, bioquímicas, patológicas e comportamentais observadas em humanos afetados pela doença referida; responder a tratamentos farmacológicos da mesma forma que é encontrada em humanos; por fim, ter uma base metodológica fundamentada na similaridade com a etiologia da doença. De uma maneira geral, transtornos neuropsiquiátricos representam um grande desafio quando se refere ao desenvolvimento de modelos animais. Com exceção de algumas doenças degenerativas, os diagnósticos desses transtornos baseiam-se somente em sintomas, sinais e o curso da doença. Sintomas essencialmente abstratos, reconhecidos apenas através da comunicação humana (alucinações, tristeza, culpa, delírios), são praticamente impossíveis de serem distintos em animais, tornando a validação de modelos animais de transtornos neuropsiquiátricos complexa (NESTLER; HYMAN, 2010).

Os vários estudos acerca da etiologia do TAB permitiram uma vasta compreensão sobre as alterações fisiopatológicas e comportamentais encontradas em pacientes bipolares, permitindo que fossem, então, desenvolvidos modelos animais para o estudo do tal. No entanto, ainda atualmente, não existe um modelo animal ideal que mimetize as características do TAB devido a sua característica de oscilação entre quadros sintomáticos opostos, a mania e a depressão (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004). Portanto, a solução encontrada para se estudar o TAB foi desenvolvendo modelos animais de depressão (NESTLER *et al.*, 2002) e mania (EL-MALLAKH *et al.*, 2003; GESSA *et al.*, 1995) separadamente.

Os modelos animais de mania existentes atualmente podem ser divididos em três classes (YOUNG *et al.*, 2011):

- a) **Farmacológicos:** utiliza-se de substâncias químicas como psicoestimulantes (anfetamina), ouabaína (inibidor da adenosina trifosfato) e quinpirole (agonista de dopamina).

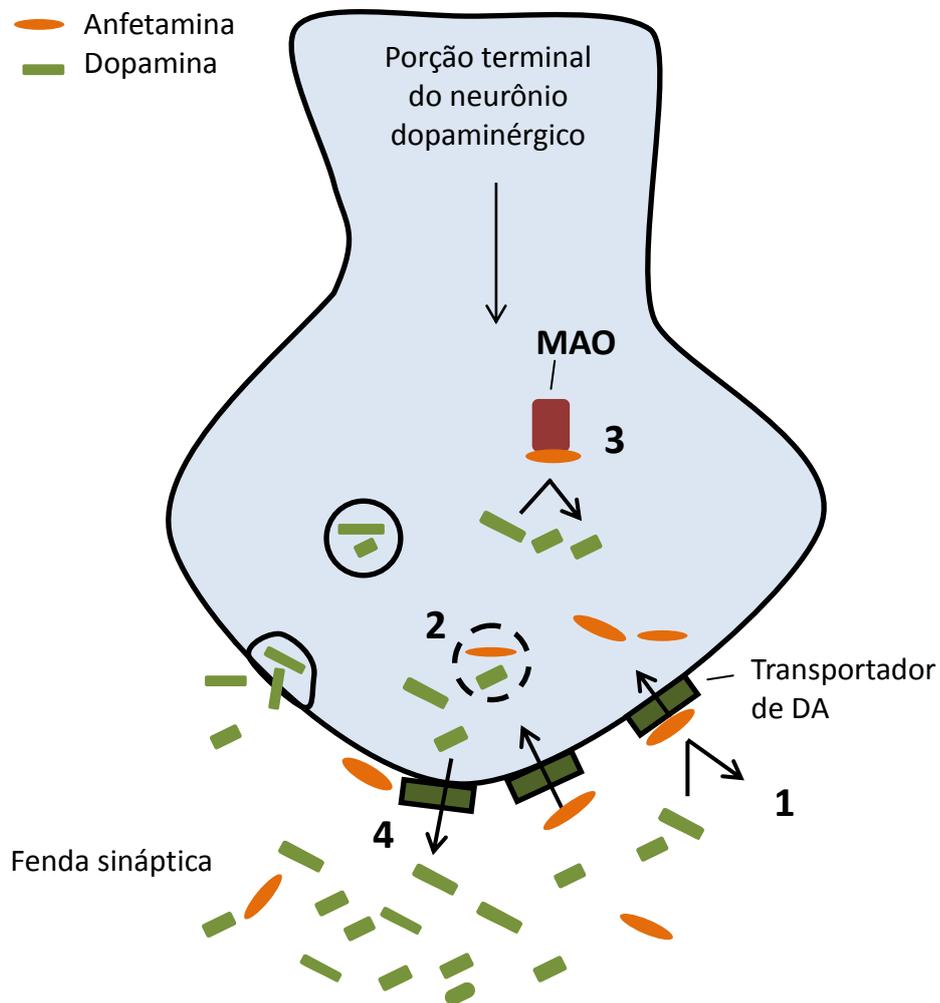
- b) **Ambientais:** são induzidas alterações ambientais como privação de sono, competição por comida, relação animal residente versus intruso e estresse causado por choque.
- c) **Genéticos:** alterações genéticas específicas são realizadas ou selecionadas em animais em prol de se obter proles com características específicas que mimetizem um ou mais sintomas da mania, como animais que tenham preferência por doce, camundongos *knockout* para o receptor 6 de glutamato e *knockdown* para o transportador de dopamina.

Entre os modelos animais de mania citados acima, o mais bem sucedido atualmente é o que utiliza a anfetamina como psicoestimulante para induzir este quadro clínico. Como características essenciais do mesmo, pode-se citar o aumento da atividade locomotora e a possibilidade de reversão do mesmo pelo uso de lítio (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004; NESTLER *et al.*, 2002), já representando os critérios de validação aparente e preditiva.

O mecanismo de ação da anfetamina envolve principalmente o sistema dopaminérgico, este referido, anteriormente, como um das principais alterações na fisiopatologia do TAB, caracterizando a validade de constructo parcial do modelo citado. Adicionalmente, vários estudos já foram feitos com este mesmo modelo demonstrando que a anfetamina além de induzir a hiperatividade, causa um aumento expressivo no estresse oxidativo do tecido cerebral (ANDREAZZA *et al.*, 2008b; FREY *et al.*, 2006a; FREY *et al.*, 2006b; FREY *et al.*, 2006c;2006d), característica encontrada em pacientes bipolares (ANDREAZZA *et al.*, 2008a; FREY *et al.*, 2007a).

Fisiologicamente, a anfetamina aumenta a disponibilidade de dopamina (DA) na fenda sináptica através do seguinte conjunto de mecanismos (Figura 5): 1) ligando-se no transportador de DA, impedindo-o de recaptar a dopamina presente na fenda sináptica; 2) interagindo com as vesículas que armazenam DA, ocasionando a liberação do seu conteúdo no citosol; 3) ligando-se a enzima monoamina oxidase (MAO), bloqueando a degradação de DA, portanto deixando a mesma livre em maior quantidade no citosol; 4) interagindo com o transportador de recaptção de DA, fazendo com que o mesmo atue reversamente levando a DA que se encontra livre no citosol para a fenda pré-sináptica (SULZER *et al.*, 2005). Resumidamente, aumenta a disponibilidade de dopamina na fenda sináptica o que permite que a mesma atue por mais tempo nos seus respectivos receptores pós-sinápticos.

Figura 5 - Mecanismo de ação da anfetamina



Esquemática indicando o mecanismo de ação da anfetamina nas porções pré-sinápticas de neurônios dopaminérgicos. (Fonte: <http://www.cnsforum.com> - versão adaptada)

1.1.5. Tratamento do TAB

Os medicamentos utilizados no tratamento de um paciente bipolar dependem tanto dos sintomas e da severidade do quadro apresentado, quanto da resposta do paciente ao tratamento. Por ser este um transtorno que se apresenta na forma de uma inconstância sintomática, uma variedade de classes medicamentosas são utilizadas no seu tratamento, tais como antipsicóticos, anticonvulsivantes e antidepressivos (SEDDON; NUTT, 2007). Em 1994, a APA publicou o primeiro guia operacional de tratamento do TAB e neste dividiu

esses medicamentos em cinco grupos: 1) estabilizantes de humor; 2) agentes antimaníacos; 3) agentes antidepressivos; 4) medicação adjunta; 5) medicações novas ou atípicas (FOUNTOULAKIS *et al.*, 2005). Representando a complexidade do tratamento do TAB, as tabelas a seguir detalham o tratamento recomendado do mesmo de acordo com o tipo referido e os quadros clínicos apresentados. As mesmas foram adaptadas de um *Guideline Update* publicado na revista *Bipolar Disorders* por YATHAM *et al.* (2009)

Tabela 2 – Recomendações para o tratamento farmacológico da mania aguda

Primeira linha	Lítio, divalproex, olanzapina, risperidona, quetiapina, quetiapina XR^a , aripiprazol, ziprasidona lítio ou divalproex + risperidona, lítio ou divalproex + quetiapina, lítio ou divalproex + olanzapina, lítio ou divalproex + aripiprazol^a
Segunda linha	Carbamazepina, ECT, asenapina^a , monoterapia de paliperidona^a Lítio ou divalproex + asenapina^a
Terceira linha	Haloperidol, clorpromazina, clozapina, oxcarbazepina^a , tamoxifeno^a Lítio ou divalproex + haloperidol, lítio + carbamazepina,
Não recomendado	Monoterapia com gabapentina, topiramato, lamotrigina, verapamil, tiagabina Risperidona + carbamazepina, olanzapina + carbamazepina^a
ECT = eletroconvulsoterapia ^a Novo	

Tabela 3 - Recomendações para o tratamento farmacológico da depressão aguda do TAB tipo I^a

Primeira linha	Lítio, lamotrigina, quetiapina, quetiapina XR^b , lítio ou divalproex + ISRS, olanzapina + ISRS, lítio ou divalproex, lítio ou divalproex + bupropiona
Segunda linha	Quetiapina + ISRS, divalproex^b , lítio ou divalproex + lamotrigina, modafinil adjunto^b
Terceira linha	Carbamazepina, olanzapina, lítio + carbamazepina, lítio + pramipexol, lítio ou divalproex + venlafaxina, lítio + IMAO, ECT, lítio ou divalproex ou APA + ATC, lítio ou divalproex ou carbamazepina + ISRS + lamotrigina, AEP adjunto, riluzol adjunto, topiramato adjunto
Não recomendado	Monoterapia com gabapentina, monoterapia com aripiprazol^b
<p>ISRS = Inibidor seletivo de receptor de serotonina; IMAO = inibidor de monoamina oxidase; ECT = eletroconvulsoterapia; APA = antipsicóticos atípico; ATC = antidepressivo tricíclico; AEP = ácido eicosapentaenóico</p> <p>^a A manutenção de um episódio depressivo bipolar com antidepressivos permanece complexa. O médico deve equilibrar o efeito desejado de remissão com efeito indesejado de conversão de quadros.</p> <p>^b Novo</p>	

Tabela 4 - Recomendações para o tratamento farmacológico da depressão aguda do TAB tipo II

Primeira linha	Quetiapina
Segunda linha	Quetiapina + ISRS, divalproex^a , lítio ou divalproex + lamotrigina, modafinil adjunto^a
Terceira linha	Monoterapia com antidepressivos (particularmente para aqueles com hipomania não frequentes), mudar para um antidepressivo alternativo, ziprasidona^a
Não recomendado	Ver o texto sobre as recomendações para tratamento monoterápico com antidepressivos no artigo
<p>ISRS = Inibidor seletivo de receptor de serotonina</p> <p>^a Novo</p>	

Tabela 5 - Recomendações para a manutenção da farmacoterapia do TAB

Primeira linha	Lítio, monoterapia com lamotrigina (eficácia limitada na prevenção da mania), divalproex, olanzapina, quetiapina^a lítio ou divalproex + quetiapina^a, risperidona ILD^a, risperidona ILD adjunta^a, aripiprazol (principalmente para prevenir a mania)^a, ziprasidona adjunta^a
Segunda linha	Carbamazepina, lítio + divalproex, lítio + carbamazepina, lítio ou divalproex + olanzapina, lítio + risperidona, lítio + lamotrigina, olanzapina + fluoxetina
Terceira linha	Fenitoína adjunta, clozapina adjunta, ECT adjunta, topiramato adjunto, ácidos graxos ômega-3 adjunto, oxcarbazepina adjunto, ou gabapentina adjunto
Não recomendado	Flupentixol adjunto, monoterapia com gabapentina, topiramato ou antidepressivos
ILD = injeção de longa duração; ECT = eletroconvulsoterapia ^a Novo	

Tabela 6 - Recomendações para a manutenção da farmacoterapia do TAB tipo II

Primeira linha	Lítio, lamotrigina
Segunda linha	Divalproex, lítio ou divalproex ou antipsicótico atípico + antidepressivo, combinação de dois dos seguintes: lítio, lamotrigina, divalproex ou antipsicótico atípico
Terceira linha	Carbamazepina, antipsicótico atípico, ECT
Não recomendado	Gabapentina
ECT = eletroconvulsoterapia	

O lítio e o valproato (nas tabelas, representado por divalproex) se encontram no grupo dos estabilizantes de humor e, como se pode observar, são as drogas mais conhecidas e utilizadas no que se refere ao tratamento do TAB. Embora o seu mecanismo de ação ainda não seja completamente conhecido, observa-se que o lítio diminui a excitabilidade neuronal pela modulação dos canais de sódio e possivelmente protegendo o tecido neural. Atua, em adição, em nível de segundos-mensageiros: com as proteínas ligantes do nucleotídeo guanina (proteínas G), resultando no aumento ou diminuição da adenosina monofosfato cíclica

(AMPC); inibindo a formação de inositol da via fosfoinositol; e reduzindo a ação da enzima proteína quinase C (PKC). O valproato atua inibindo a liberação de glutamato e os canais de sódio; induz a expressão de genes e proteínas neuroprotetoras, bem como atua de forma semelhante ao lítio quanto a PKC (BRUNELLO, 2004; SEDDON; NUTT, 2007). Pesquisas feitas com tecidos cerebrais *post-mortem* e células periféricas de pacientes bipolares mostraram um aumento na atividade de sinalização celular a partir das vias das proteínas G e do fosfoinositol (PEREZ *et al.*, 2000; WANG; FRIEDMAN, 1996). Pode-se inferir, portanto, que a eficiência desses medicamentos no tratamento do TAB reside, em parte, neste quesito.

Embora a eficácia desses medicamentos seja conhecida, os efeitos colaterais dos mesmos são estimáveis. O lítio é tóxico em concentrações acima de 1,5mmol/l no plasma sanguíneo e pode causar distúrbios gastrointestinais, tremor, sedação, letargia, aumento de peso, poliúria, polidipsia, além de hiperparatireoidismo e alterações nas funções renais e tireóideas. Já o valproato requer monitoramento da função renal e hepática a cada seis meses, além de possivelmente causar problemas gastrointestinais, ganho de peso, sedação, perda de cabelo, trombocitopenia, disfunção de plaquetas, ataxia, ovários policísticos e hiperandrogenismo em mulheres, pancreatite e ter efeitos teratogênicos (SEDDON; NUTT, 2007). Portanto, ainda com a existência desses medicamentos, um novo, com efeitos colaterais mínimos e que possua a mesma ou uma melhor eficácia que os medicamentos citados, se faz necessário para o tratamento do TAB.

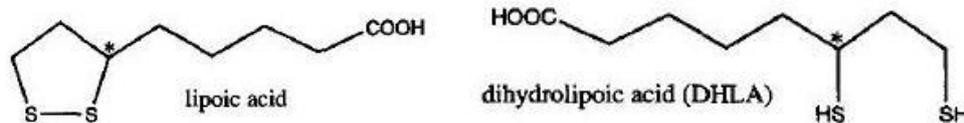
1.2. ÁCIDO LIPÓICO

O ácido lipóico (AL), conhecido também como ácido tióico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico) (PACKER *et al.*, 1997; PACKER *et al.*, 1995), é um composto de baixo peso molecular encontrado tanto em células procarióticas quanto eucarióticas (BIEWENGA *et al.*, 1997), insolúvel em água, porém solúvel em solventes orgânicos (PACKER *et al.*, 1995). Sabe-se que, em mamíferos, o AL pode ser sintetizado *de novo* na mitocôndria a partir de ácido graxos e cisteína (CARREAU, 1979) ou pode ser obtido a partir da dieta, em alimentos como carnes de coração, rins e fígado e, em um grau menor, frutas e vegetais (AKIBA *et al.*, 1998). Estudos mostram que através da administração oral, o AL é absorvido rapidamente no trato gastrointestinal, chegando ao seu pico de concentração na corrente sanguínea em quase

duas horas após sua administração (SMITH *et al.*, 2004); possui meia vida plasmática de aproximadamente 30 minutos; biodisponibilidade absoluta entre 20 e 38% dependendo do isômero e da formulação (HERMANN *et al.*, 1996); e a capacidade de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (ERSAHIN *et al.*, 2010). A exemplo, um estudo com ratos novos e velhos tratados com doses diárias de AL de 100 mg/kg i.p. durante 7-14 dias demonstrou que o mesmo se acumula em várias áreas cerebrais, variando sua concentração de acordo com a idade do animal e a área cerebral avaliada (ARIVAZHAGAN *et al.*, 2002).

A nível celular, o AL atua como um importante cofator para a função catalítica de várias enzimas chaves do metabolismo oxidativo, ligando-se a grupos acil e transferindo-os de uma parte do complexo enzimático para outra (ROCK, 2009). Quando administrado exogenamente, uma vez que entra nas células o ácido lipóico é rapidamente reduzido a ácido dihidrolipóico (DHLA) pelas lipoamidas desidrogenases da mitocôndria ou pelo sistema composto pela tioredoxina e sua respectiva enzima (tioredoxina redutase), processos os quais são dependentes de NAD(P)H.

Figura 6 - Estrutura molecular do AL e sua forma reduzida (DHLA)



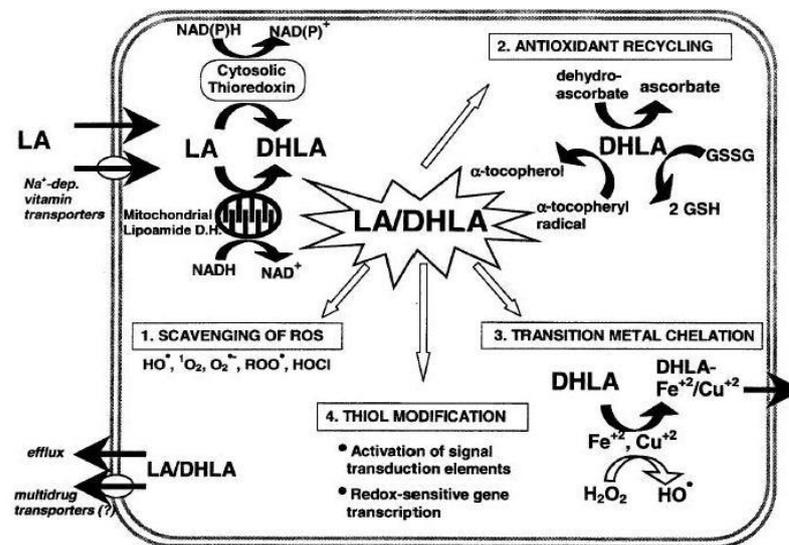
O ácido lipóico é um ditiol formado por oito carbonos e possui um centro quiral evidenciado por um asterisco na figura. (Fonte: BIEWENGA *et al.* 1997)

Estudos (ERSAHIN *et al.*, 2010; PACKER *et al.*, 1997; ROCK, 2009; SANTOS *et al.*, 2010a; SMITH *et al.*, 2004) apontam que ambas as formas possuem propriedades antioxidantes como prevenir a peroxidação lipídica, reparar danos oxidativos, induzir a expressão de genes de enzimas antioxidantes, sendo as principais:

- 1) Quelar metais: AL e DHLA possuem a capacidade de se ligar a íons de metais redox ativos, os quais participam da formação de EROs, como o ferro e o cobre. Essa capacidade se dá devido a sua estrutura a qual possui uma parte flexível semelhante à de ácidos graxos, possuindo um arranjo de cargas que permite o envolvimento parcial desses íons, neutralizando-os.

- 2) Neutralizar espécies reativas de oxigênio: O AL e DHLA, devido aos seus grupos tióis, conseguem transformar radicais livres, como radicais hidroxilas, oxigênios singletes, peroxinitrito, superóxido, radicais peroxil e óxido nítrico, em formas menos reativas.
- 3) Regenerar antioxidantes endógenos: A dupla redox DHLA/LA possui um potencial redox (tendência de uma espécie química de adquirir elétrons) de -32V , mais poderoso do que de duplas como a glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) e ácido ascórbico/dihidroascorbato, que possuem $-0,24$ e $-0,28\text{V}$ respectivamente. Sugere-se, portanto, que o DHLA atua sobre as formas oxidadas dessas outras duplas, reduzindo e mantendo-as em sua forma ativa. Em adição, acredita-se que AL induz a síntese de GSH através do aumento da disponibilidade de cisteína, precursor desse composto.

Figura 7 - Atividades antioxidantes do AL e/ou DHLA.



O AL (na figura representado como LA) quando entra na celular é reduzido a DHLA. Ambas as formas exercem propriedades antioxidantes como: 1 - transformar EROs em formas menos reativas; 2 - reciclar antioxidantes endógenos; 3 - quelar metais; 4 - estimular certos sinais de via de transdução, bem como a expressão de genes redox sensíveis. (Fonte: Smith *et al.* 2004)

Essas características fazem com que o AL seja apontado como uma alternativa contra o estresse oxidativo, mecanismo relacionado com várias fisiopatologias importantes:

isquemia-reperfusão, doenças neurodegenerativas, neuropatia diabética e erros inatos do metabolismo (PACKER *et al.*, 1997). Portanto, a descoberta de que o ácido lipóico e sua forma reduzida (ácido dihidrolipóico) possuem uma atuação ligada diretamente ao metabolismo oxidativo permitiu que várias pesquisas fossem desenvolvidas em prol de testá-los com fins terapêuticos.

Ersabin e colaboradores apresentaram resultados positivos quanto a: 1- a supressão da geração de espécies reativas de oxigênio; 2 – a preservação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e 3 – a preservação da integridade do DNA em animais com hemorragia subaracnóidea induzida tratados com ácido lipóico (ERSAHIN *et al.*, 2010). Outros pesquisadores demonstraram que o ácido lipóico possui efeitos preventivos no aumento de peróxido de hidrogênio em animais submetidos a tratamento agudo com ácido N-acetil aspártico (PEDERZOLLI *et al.*, 2010).

Paralelamente, uma grande quantidade de pesquisas sustenta os efeitos protetores do ácido lipóico quanto à diabetes, seja essa do tipo I ou II. Faust *et al.* apresentou em seus experimentos que a taxa de animais que desenvolviam diabetes tipo I induzida por administração de ciclofosfamida diminuiu a metade, de 60 para 30%, quando os mesmos eram tratados antes e depois com ácido lipóico (10mg/kg) (FAUST *et al.*, 1994).

Militão e colaboradores demonstraram que o AL além de reduzir em 65% a porcentagem de animais que entraram em convulsão após o tratamento com pilocarpina, aumentou em 240% o período de latência para a primeira convulsão, bem como acresceu em 30% o número de animais sobreviventes. Nos testes bioquímicos, animais tratados com AL apresentaram os seguintes resultados quanto ao corpo estriado: diminuíram em 42% o nível de peroxidação lipídica e 43% no conteúdo de nitrito; aumentaram em 53, 88 e 19% a atividade enzimática da SOD, catalase e GPx, respectivamente, quando comparados com o grupo tratado somente com pilocarpina (MILITAO *et al.*, 2010).

Experimentos também indicam que o ácido lipóico apresenta efeitos satisfatórios no tratamento de neuropatia diabética. Em uma metanálise de experimentos foi concluído que três semanas de tratamento com doses intravenosas diárias de 600mg de AL melhoram significativamente os sintomas da dor neuropática em humanos (MIJNHOUT *et al.*, 2010).

Resultados positivos são também encontrados quando se trata de injúria por isquemia-reperfusão (SERBINOVA *et al.*, 1992) e também contra doenças neurodegenerativas como

Alzheimer (ABDUL; BUTTERFIELD, 2007; MACZUREK *et al.*, 2008) e Parkinson (BHARAT *et al.*, 2002).

Como demonstrado em várias pesquisas, pré-clínicas e clínicas, o AL é um antioxidante poderoso, de fácil administração, absorção e que possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica facilmente. Além disso, estudos indicam que o mesmo possui efeitos colaterais não significativos. Em animais, a tolerância ao AL varia de espécie para espécie. Estudos apresentaram que através de administração oral em tratamento agudo a dose letal mediana (DL₅₀) é de 400-500mg/kg para cachorros, 500mg/kg para camundongos, 30mg/kg para gatos e >2000mg/kg para ratos. Já em humanos, vários estudos clínicos, alguns incluindo placebos, já testaram doses de até 2400mg/dia por períodos de tempo de até dois anos sem terem sido relatados efeitos colaterais sérios além da hipoglicemia (motivo pelo qual é utilizado em testes contra diabetes). São apresentados apenas transtornos gastrointestinais, dores de cabeça e *rash* cutâneo em alguns pacientes (SHAY *et al.*, 2009).

1.3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O TAB é o transtorno neurológico grave, crônico, prevalente e associado ao risco aumentado de suicídio. Por ter um caráter oscilante entre dois principais quadros clínicos opostos, é um distúrbio de difícil diagnóstico e tratamento. Os estabilizantes de humor existentes no mercado atualmente, apesar de eficazes, ainda apresentam notáveis efeitos colaterais tendo consequências na vida dos pacientes em constante tratamento, sendo interessante, portanto, a descoberta de uma nova substância eficaz e que permita uma melhor qualidade de vida aos mesmos. Uma vez que a mania do TAB tem como seu componente o estresse oxidativo e o ácido lipóico apresenta efeitos antioxidantes amplos e comprovados em outros transtornos neuropsiquiátricos além de apresentar baixos índices de efeitos colaterais em animais e humanos, é razoável hipotetizar que o AL apresentará bons resultados de reversão e prevenção no modelo de mania induzida por anfetamina proposto por Andrezza e colaboradores (ANDREAZZA *et al.*, 2008b). É importante ressaltar que ainda não havia publicado nenhum estudo que relacionasse o efeito antioxidante do AAL com o tratamento da mania do transtorno afetivo bipolar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar se o AAL é capaz de reverter e/ou prevenir a mania no modelo animal de mania induzida por d-anfetamina, verificando a participação de defesas antioxidantes no seu mecanismo de ação antimaniaca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as alterações comportamentais causadas aos animais pela administração de d-anfetamina e a prevenção e/ou reversão destas pelo uso do AAL;
- Determinar as alterações em parâmetros de estresse oxidativo como: atividade de SOD, glutathiona reduzida e peroxidação lipídica no hipocampo, córtex pré-frontal e núcleos da base de animais submetidos ao modelo animal de mania;
- Avaliar as alterações nos níveis de BDNF em animais tratados com AAL no modelo de mania induzida por anfetamina;

3 METODOLOGIA

3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.1.1. Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos (*Mus musculus*) machos (peso: 20-30 g), obtidos no biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram utilizados de 6-8 animais por grupo, sendo os mesmos divididos e mantidos em caixas de acordo com seus respectivos tratamentos, com um ciclo claro/escuro de 12 h, água e ração animal *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) já tendo sido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA-UFC).

3.1.2. Drogas utilizadas

A d-anfetamina (d-ANF), o carbonato de lítio (Li) e o ácido DL-alfa-lipóico (AAL) foram obtidos na Sigma (St. Louis, MO, USA). Todas as outras substâncias usadas foram de grau analítico. O AAL foi suspenso em 0,2% de carboxil metil celulose (CMC), enquanto todas as outras drogas foram dissolvidas em salina 0,9%.

3.1.3. Planejamento experimental

Foram feitos dois tipos de protocolos: reversão e prevenção. No primeiro, foi reproduzido o tratamento do episódio maníaco agudo conforme descrito previamente (FREY *et al.*, 2006d) e, no segundo, simulada a fase de manutenção do tratamento do TAB (FREY *et al.*, 2006c). Os animais foram tratados com duas doses de AAL, 50 e 100 mg/kg, doses essas escolhidas por apresentarem resultados positivos em outros experimentos que relacionam estresse oxidativo e transtornos neuropsiquiátricos, como os mencionados anteriormente na introdução. Como droga antimaníaca padrão foi utilizado o lítio na dose padrão de 47,5

mg/kg. Cada grupo foi constituído por seis a oito animais. Os animais foram tratados conforme o esquema seguinte:

Figura 8 – Planejamento experimental

PROTOCOLO DE REVERSÃO			PROTOCOLO DE PREVENÇÃO		
Grupos	Dias		Grupos	Dias	
	1-7	8-14		1-7	8-14
1. ANF/SAL	d-ANF	+ Sal	1. SAL/ANF	Sal	+ d-ANF
2. ANF/Li		+ Li	2. Li/ANF	Li	
3. ANF/AAL50		+ AAL50	3. AAL50/ANF	AAL 50	
4. ANF/AAL100		+ AAL100	4. AAL100/ANF	AAL 100	
5. SAL/SAL	Sal	+ Sal	5. SAL/SAL	Sal	+ Sal
6. SAL/AAL50		+AAL50	6. AAL50/SAL	AAL 50	
7. SAL/AAL100		+ AAL100	7. AAL100/SAL	AAL 100	

Legenda: d-ANF = anfetamina 2mg/kg intraperitoneal (i.p.); Sal = salina 0,9% i.p.; Li = lítio 47,5 mg/kg i.p.; AAL 50 = ácido α -lipóico 50mg/kg via oral (v.o.); AAL 100 = ácido α -lipóico 100mg/kg v.o.

No 14º dia de tratamento de ambos os protocolos, a atividade locomotora foi avaliada individualmente 2 h após a última injeção. Os camundongos foram sacrificados por decapitação imediatamente após o teste de campo aberto e as áreas cerebrais escolhidas dissecadas (hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal), rapidamente congeladas e armazenadas a -70° C até a análise bioquímica. As referidas áreas cerebrais foram escolhidas por causa do seu conhecido envolvimento na fisiopatologia do TAB: o hipocampo tendo participação no sistema límbico, o corpo estriado no controle dos movimentos e o pré-frontal em funções cognitivas.

3.1.4 Teste comportamental (Campo Aberto)

Os animais foram colocados em um campo aberto de acrílico, com área de 30 x 30 cm, piso dividido em nove quadrantes iguais (Figura 7) e iluminado por luz vermelha. Os mesmos

foram habituados durante 1 minuto ao campo aberto e, posteriormente, submetidos ao teste durante 5 minutos. Foi contabilizado o número de cruzamentos (*crossings*), vezes em que o animal atravessa completamente de um quadrante para o outro (atividade locomotora horizontal), e *rearings*, quando o animal se apoia somente sobre as duas patas traseiras sem apoiar as dianteiras nas paredes (atividade locomotora vertical), (ARCHER, 1973).

Figura 9 – Campo aberto

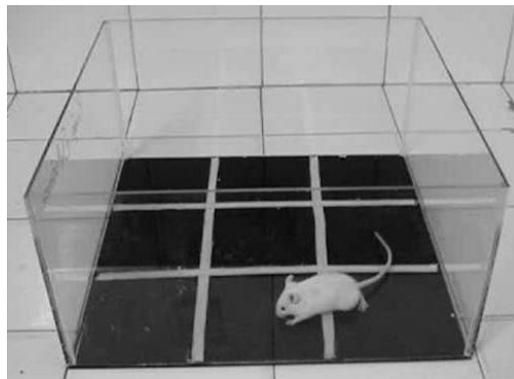


Ilustração do aparato utilizado para a contagem de *crossings* e *rearings* durante a realização do teste comportamental campo aberto em camundongos. Dimensões: 30 x 30 cm. (Fonte: Rafaela Cordeiro)

3.1.5 Determinações bioquímicas

3.1.5.1 Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada de acordo com SUN *et al.* (1988). A quantidade da enzima foi avaliada medindo-se a sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazólio (NBT). Neste método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera O_2^- o qual reduz o NBT produzindo formazan que absorve no comprimento de onda de 560nm. Na presença da SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade da SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%.

As áreas cerebrais foram previamente preparadas para o teste. Colocadas em ependorffs juntamente com tampão fosfato (10%), as respectivas áreas cerebrais são submetidas à ação do homogeneizador para formar uma solução homogênea chamada de homogenato. Em seguida, amostras dos mesmos foram centrifugadas (10 minutos, 3600 rpm a 4°C). O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para o ensaio utilizou-se o sobrenadante. Em uma câmara escura foram misturados 1 ml do meio de reação (tampão fosfato 50 mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8), 30 µL das amostras das áreas cerebrais, 150µL do NBT 75µM e 300µL riboflavina 2µM. Os tubos contendo as soluções obtidas foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. Ao término do tempo, levou-se o material para análise no espectrofotômetro, com absorbância de 560nm. A dosagem da concentração de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.1.5.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Este método é baseado na reação do reagente de Ellman (DTNB) com grupos tiol livres (SEDLAK; L, 1982). Primeiramente, as áreas cerebrais foram homogeneizadas como descrito previamente em tampão 0,02 M de EDTA (10% w/v). A 65,57µL de cada homogenato amostral foram adicionados 52,45µL de água destilada e 13,11µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 65,57µL do sobrenadante e acrescidos 131,14µL de tampão Tris-HCl 0,4M pH 8,9 e 3,27µl de DTNB 0,01M. Após 1 minuto da reação, foi feita a leitura da coloração em 412nm através do leitor de placas. A concentração de glutathiona reduzida é expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva-padrão.

3.1.5.3 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído)

O grau de lipoperoxidação nos tecidos foi medido através da determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método descrito por HUONG *et al.* (1998), realizando o seguinte protocolo: as amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4; em seguida, 63µL do homogenato

amostral foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo este centrifugado (7000 rpm/15 min). Posteriormente, 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturados com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Estas amostras foram então aquecidas em um banho de água a 95°C por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e foi expressa como mmol tecido MDA/g. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para a obtenção da curva-padrão de malonildialdeído (MDA), foram preparadas diluições em série (16,77; 9,16; 4,8; 2,463; 1,247 e 0,627 µmol) a partir da solução padrão de MDA. A leitura da absorvância foi realizada a 520 e 535 nm e, para determinação da equação da curva-padrão de MDA, o valor utilizado foi a subtração da leitura em 535 da leitura em 520nm.

3.1.5.4 Determinação dos níveis de BDNF no hipocampo

A área escolhida para a determinação dos níveis de BDNF foi o hipocampo uma vez que a mesma é uma das principais áreas de expressão do mesmo, como também é uma das áreas envolvidas e afetadas na fisiopatologia do TAB como foi mencionado anteriormente. Uma homogeneização das áreas cerebrais (hipocampo) foi feita a 20 volumes em tampão PBS pH 7,4 e o nível de BDNF de cada amostra foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como picograma mostrando a massa de proteína BDNF/mg de proteína total determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

3.1.6 Análise estatística

Foram feitos testes não paramétricos para a análise estatística dos testes comportamentais e ANOVA e teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls para os dados paramétricos. O programa de computador usado foi o Graph Pad InStat 5.0. para Windows. Em todos os casos, foi utilizado o critério de significância de $p < 0,05$.

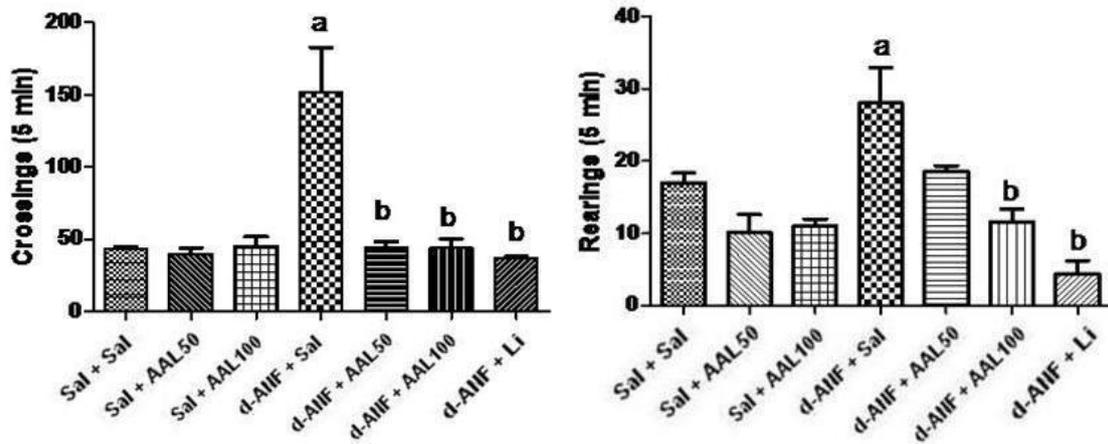
4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS COM MANIA INDUZIDA POR D-ANF E TRATADOS COM AAL

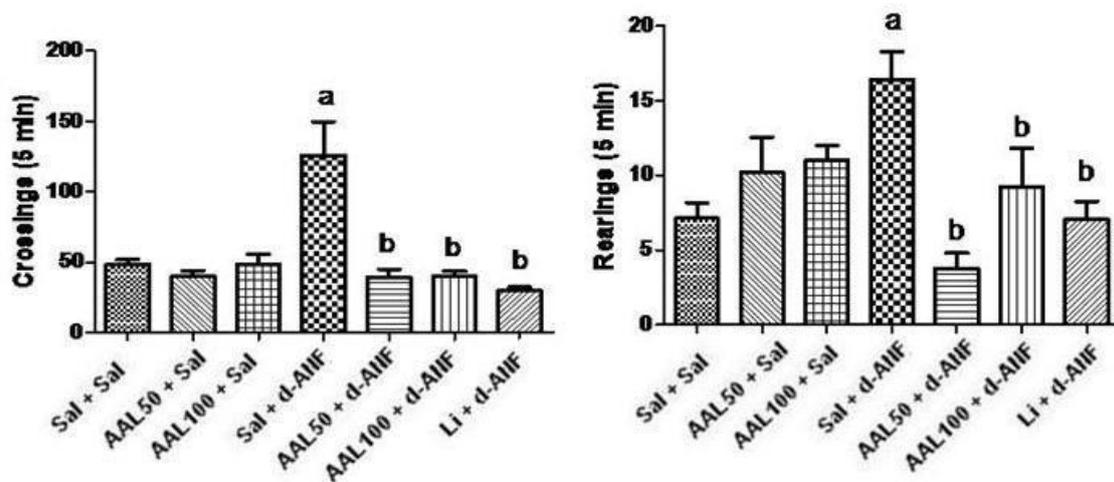
Como se pode observar nas figuras 10A e 10B, os animais tratados somente com d-ANF (2 mg/kg) apresentaram a atividade locomotora aumentada significativamente quando comparados aos do grupo controle tanto no tratamento de reversão (*crossings* [F6,68=15.91, $p < 0.001$], *rearings* [F6,56= 8.35, $p < 0.05$]) quanto prevenção (*crossings* [F6,79= 13.39, $p < 0.001$]; *rearings* [F6,67= 3.19, $p < 0.05$]). Os animais que foram tratados com AAL (50 e 100 mg/kg) tiveram a atividade locomotora horizontal (número de *crossings*) reduzida em 250 e 212% nos tratamentos de reversão [F6,67= 15.79, $p < 0.001$] e prevenção ($p < 0.001$) respectivamente quando comparados aos animais tratados somente com d-ANF (2 mg/kg), resultados estes semelhantes aos obtidos com a administração do Li (47,5 mg/kg). Quanto à atividade locomotora vertical (número de *rearings*), ambas as doses de AAL foram eficazes no tratamento de prevenção ($p < 0.001$), enquanto no de reversão, somente o da dose de 100mg/kg [F6,56=8.35, $p < 0.05$]. É importante ressaltar que nos tratamentos de reversão e prevenção somente com AAL (50 ou 100 mg/kg) não foram obtidas alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados ($p > 0.05$).

Figura 10 - Número de *crossings* e *rearings* apresentados no teste de campo aberto após os protocolos de reversão (A) e prevenção (B).

A



B



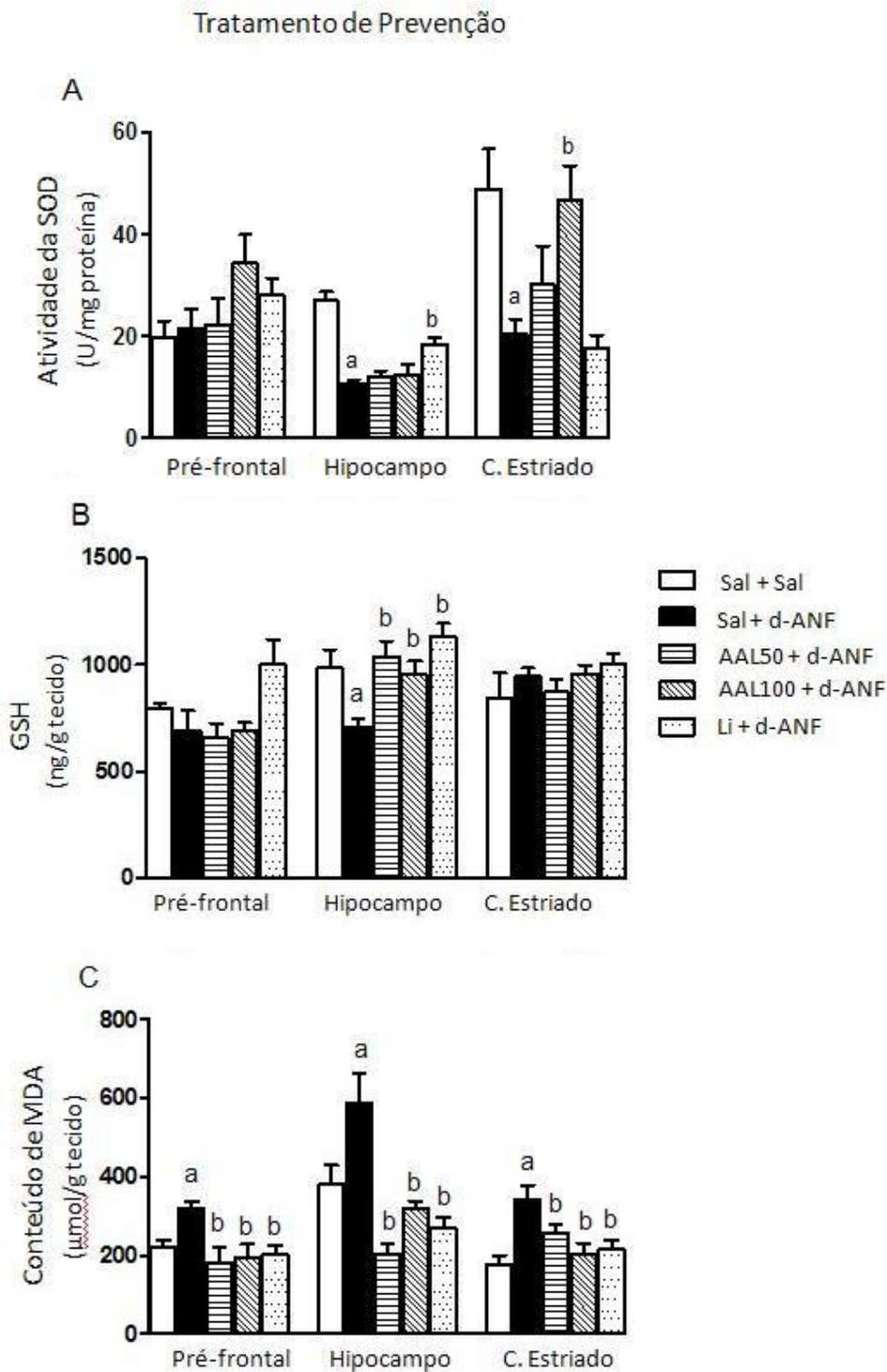
As barras representam as médias \pm o erro padrão da média. a: $p < 0.05$ vs. Grupo Sal+Sal, de acordo com ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*; b: $p < 0.05$ vs. Grupo d-ANF + Sal, de acordo com o ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Abreviações: AAL50 = ácido alfa-lipóico 50mg/kg, AAL100 = ácido alfa-lipóico 100mg/kg, d-ANF = anfetamina, Li = lítio, Sal = salina.

4.2 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.2.1. Protocolo de prevenção

A administração de d-ANF diminuiu a atividade da SOD no HC e CE quando comparado aos animais controles [F4,33= 22.96; $p < 0.001$]. Apenas os pré-tratamentos com Li no HC ($p < 0.01$) e AAL 100 mg/kg no ST [F4,32=5.50; $p < 0.05$] foram capazes de prevenir significativamente a diminuição da atividade dessa enzima quando comparados aos animais tratados somente com d-ANF (figura 11A). O conteúdo de GSH (figura 11B) diminuiu com a administração de d-ANF no HC quando comparado com os animais controles [F4,45=3.82; $p < 0.05$]. Essa redução foi prevenida pelo tratamento com AAL 50 mg/kg, 100 mg/kg e Li ($p < 0.05$). Não houve alterações nos níveis de GSH no CPF e CE ($p > 0.05$). Os níveis de TBARS, representado pelo conteúdo de malonildialdeído (MDA), aumentou após o tratamento com d-ANF quando comparado com o grupo controle no CPF [F4,32=3.20; $p < 0.05$], HC [F4,28=8.74; $p < 0.001$] e CE [F4,29=5.79; $p < 0.01$]. O pré-tratamento com AAL 50 e 100 mg/kg, da mesma maneira com o Li preveniram significativamente esse aumento na peroxidação lipídica em todas as áreas cerebrais estudadas (figura 11C).

Figura 11 - Atividade da SOD, níveis de GSH e MDA no CPF, HC e CE após o protocolo de prevenção.

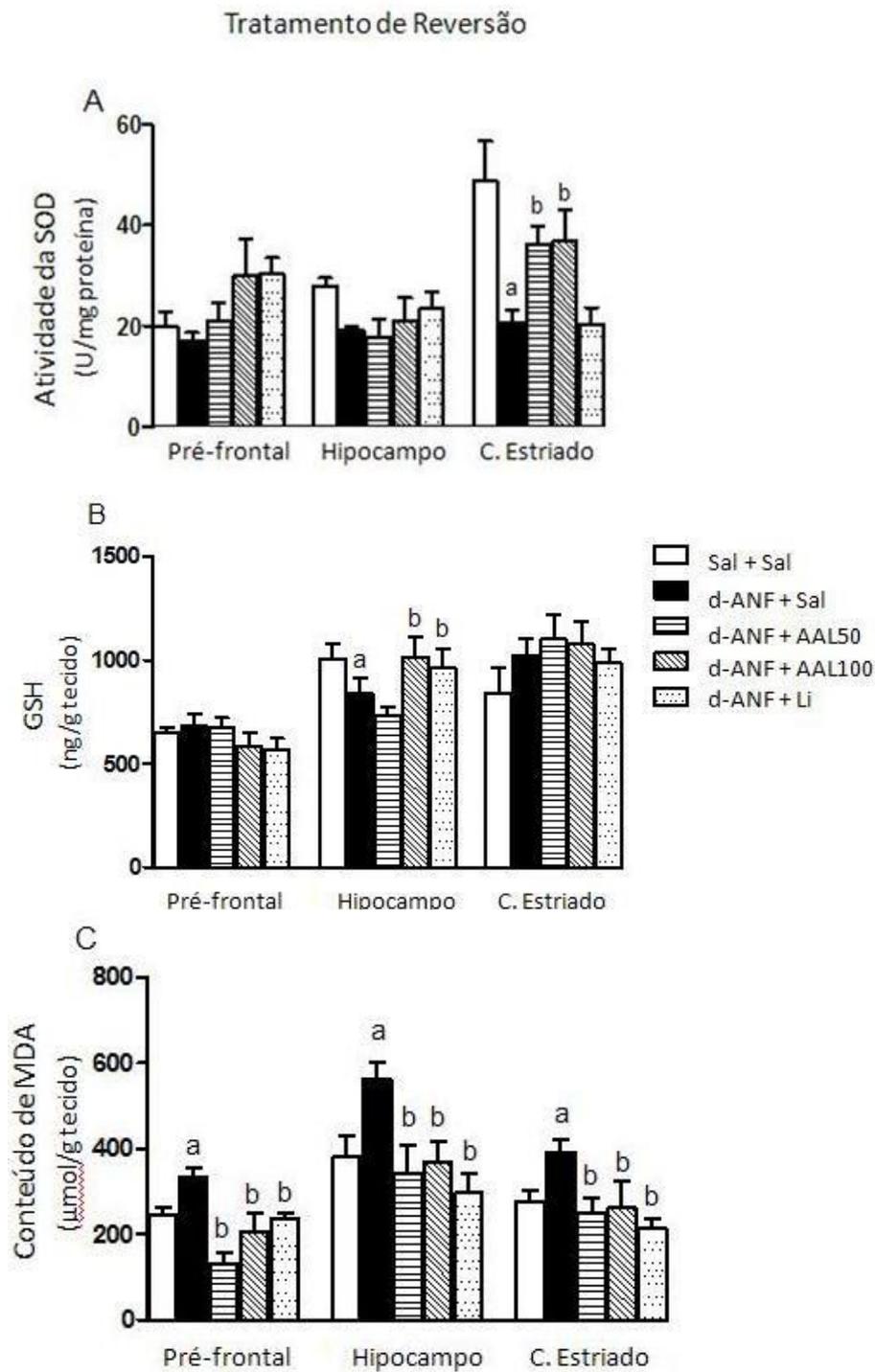


As barras representam as médias \pm o erro padrão da média (SEM). ^a: $p < 0.05$ vs. Grupo controle, ^b: $p < 0.05$ vs. Grupo Sal + d-ANF de acordo com o ANOVA seguido do Student–Newman–Keuls como teste *post hoc*. Abreviações: Sal= salina, d-ANF = d-anfetamina, AAL50 = ácido alfa-lipóico 50mg/kg, AAL100 = ácido alfa-lipóico 100mg/kg, Li = Lítio.

4.2.2. Protocolo de reversão

A administração de d-ANF diminuiu a atividade da SOD apenas no CE, quando comparado com os controles e esse efeito foi revertido pelo tratamento com AAL 50 e 100 mg/kg [F(4,34)=6.32; $p < 0.001$] (figura 12A). Uma diminuição no conteúdo de GSH foi encontrada apenas no HC dos animais tratados com d-ANF quando comparados com o grupo controle [F(4,41)=4.89; $p < 0.01$]. Os tratamentos com AAL 100 mg/kg e Li reverteram essa redução ($p < 0.05$) (figura 12B). O TBARS aumentou após o tratamento com d-ANF quando comparado com os animais controles no CPF [F(4,28)=10.34; $p < 0.001$], HC [F(4,25)=3.95; $p < 0.05$] e CE [F(4,24)=3.41; $p < 0.05$], enquanto os tratamentos com AAL 50 e 100 mg/kg, bem como Li, foram capazes de reverter significativamente esse aumento nas áreas cerebrais estudadas ($p < 0.05$) (figura 12C).

Figura 12 - Atividade da SOD, níveis de GSH e MDA no CPF, HC e CE após o protocolo de reversão.

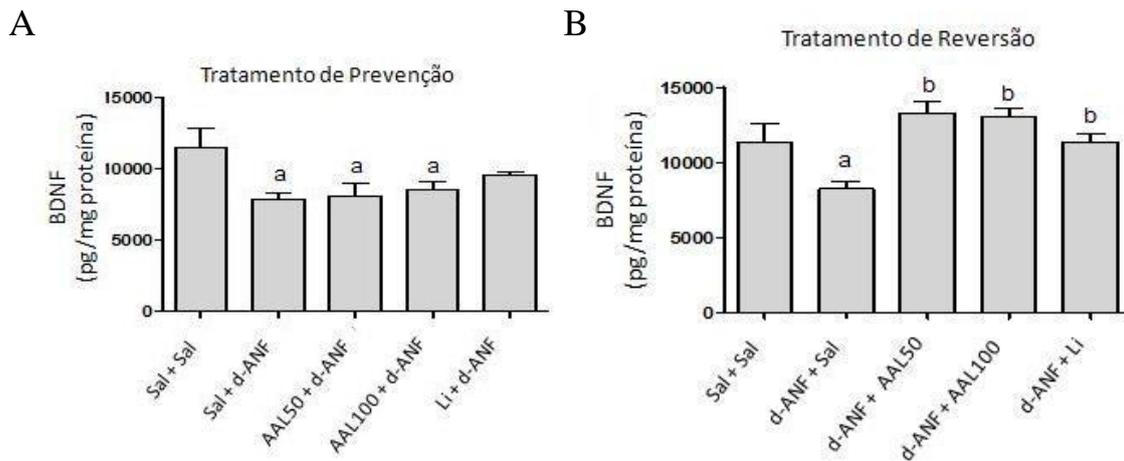


As barras representam as médias \pm o erro padrão da média (SEM). ^a: $p < 0.05$ vs. Grupo controle, ^b: $p < 0.05$ vs. Grupo d-ANF + Sal de acordo com o ANOVA seguido do Student–Newman–Keuls como teste *post hoc*. Abreviações: Sal= salina, d-ANF = d-anfetamina, AAL50 = ácido alfa-lipóico 50mg/kg, AAL100 = ácido alfa-lipóico 100mg/kg, Li = Lítio.

4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS BDNF NO HIPOCAMPO

No tratamento de prevenção, observa-se (figura 13A) que a d-ANF diminuiu os níveis de BDNF, resultado também observado nos grupos tratados com o AAL (50 e 100 mg/kg) quando comparados ao grupo controle [F4,27=3.49; $p=0.022$]. No tratamento de reversão (figura 13B), a d-ANF também diminuiu os níveis de BDNF quando comparado ao grupo controle [F4,30=7.34; $p<0.05$], no entanto, os animais tratados com AAL (50 e 100 mg/kg) e Li (47,5 mg/kg) apresentaram os níveis de BDNF restaurados ($p<0.001$).

Figura 13 - Níveis de BDNF no HC após os protocolos de prevenção (A) e reversão (B).



As barras representam as médias \pm o erro padrão da média. a: $p < 0.05$ vs., b: $p < 0.05$ vs. controle. Grupo Sal + d-ANF (tratamento de prevenção) ou d-ANF + Sal (tratamento de reversão), de acordo com o ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Abreviações: SAL= salina, d-ANF = d-anfetamina, AAL50 = ácido alfa-lipóico 50mg/kg, AAL100 = ácido alfa-lipóico 100mg/kg, Li = lítio, BDNF = fator de crescimento derivado do cérebro.

4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS APRESENTADOS

Abaixo, seguem figuras sintetizando os resultados apresentados nos protocolos de reversão (Figura 14) e prevenção (Figura 15) nos testes de comportamento e bioquímicos (ação da SOD, níveis de MDA, GSH e BDNF).

Figura 14 – Síntese dos resultados apresentados no protocolo de reversão

Protocolo de Reversão							
Teste	Parâmetro	Área	GRUPOS				
			<i>Sal + Sal</i>	<i>d-ANF + Sal</i>	<i>d-ANF + AAL50</i>	<i>d-ANF + AAL100</i>	<i>d-ANF + Li</i>
Estresse Oxidativo	SOD	CPF	c	=	=	=	=
		CE	c	↓	↑	↑	=
		HIP	c	=	=	=	=
	GSH	CPF	c	=	=	=	=
		CE	c	=	=	=	=
		HIP	c	↓	=	↑	↑
	MDA	CPF	c	↑	↓	↓	↓
		CE	c	↑	↓	↓	↓
		HIP	c	↑	↓	↓	↓
BDNF	BDNF	HIP	c	↓	↑	↑	↑
Hiperlocomoção	<i>Crossings</i>	-	c	↑	↓	↓	↓
	<i>Rearing</i>	-	c	↑	=	↓	↓

c = controle ↑ = ↓ comparado ao grupo *Sal + Sal* ↑ = ↓ comparado ao grupo *d-ANF + Sal*

Síntese dos resultados dos testes de comportamento e bioquímicos (ação da SOD, níveis de MDA, GSH e BDNF) apresentados no protocolo de reversão. Os círculos em laranja destacam os parâmetros nos quais os resultados diferiram quando comparados os grupos do AAL e do Lítio.

Figura 15 – Síntese dos resultados apresentados no protocolo de prevenção

Protocolo de Prevenção							
Teste	Parâmetro	Área	GRUPOS				
			Sal + Sal	Sal + d-ANF	AAL50 + d-ANF	AAL100 + d-ANF	Li + d-ANF
Estresse Oxidativo	SOD	CPF	c	=	=	=	=
		CE	c	↓	=	↑	=
		HIP	c	↓	=	=	↑
	GSH	CPF	c	=	=	=	=
		CE	c	=	=	=	=
		HIP	c	↓	↑	↑	↑
	MDA	CPF	c	↑	↓	↓	↓
		CE	c	↑	↓	↓	↓
		HIP	c	↑	↓	↓	↓
	BDNF	BDNF	HIP	c	↓	↓	↓
Hiperlocomoção	<i>Crossings</i>		c	↑	↓	↓	↓
	<i>Rearing</i>		c	↑	↓	↓	↓

c = controle ↑ = ↓ comparado ao grupo Sal + Sal ↑ = ↓ comparado ao grupo Sal + d-ANF

Síntese dos resultados dos testes de comportamento e bioquímicos (ação da SOD, níveis de MDA, GSH e BDNF) apresentados no protocolo de prevenção. Os círculos em laranja destacam os parâmetros nos quais os resultados diferiram quando comparados os grupos do AAL e do Lítio.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente experimento demonstraram pela primeira vez que o AAL é efetivo para prevenir e reverter as alterações locomotoras induzidas pela d-ANF em camundongos, indicando que essa substância pode ser eficaz no tratamento de episódios agudos de mania, como também para a manutenção do tratamento do TAB.

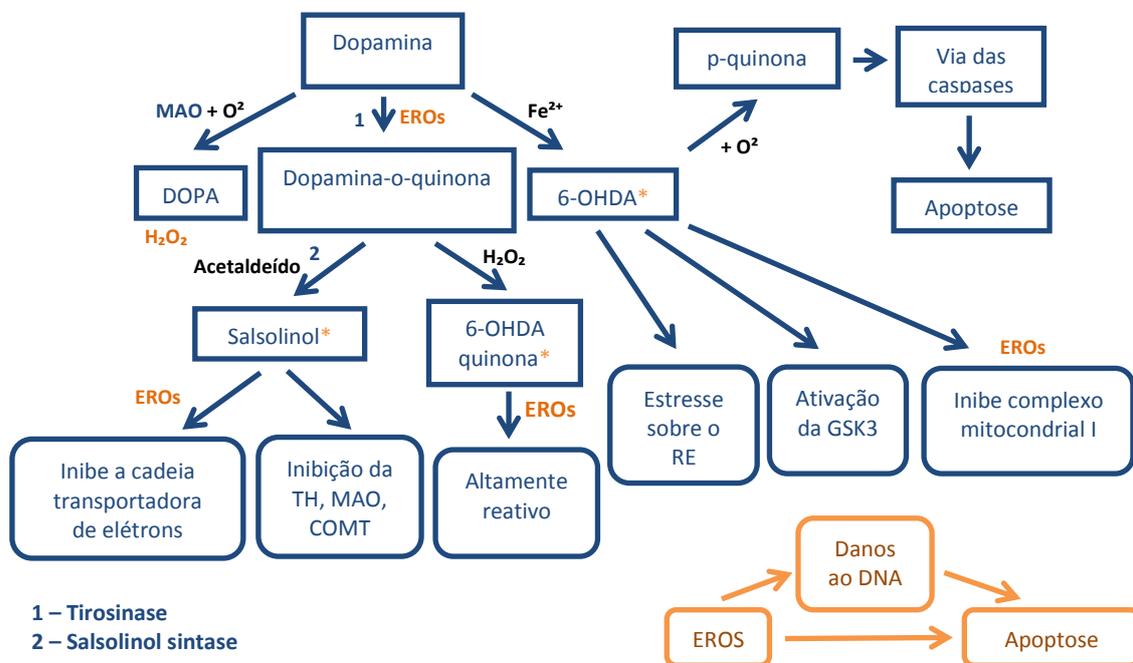
O modelo de mania induzida por d-ANF é baseado na observação da hiperlocomoção, bem como de alterações de marcadores de estresse oxidativo nas regiões do cérebro implicadas na patofisiologia do TAB (hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal) (FREY *et al.*, 2006a; FREY *et al.*, 2006b; FREY *et al.*, 2006c). Este modelo animal mimetiza alterações comportamentais (por exemplo, a hiperatividade) e neuroquímicas observadas em indivíduos bipolares. Como mencionado anteriormente, estudos precedentes estabeleceram que estabilizadores de humor convencionais, como o lítio e o valproato, são capazes de prevenir e reverter as alterações observadas em animais tratados com d-ANF, portanto indicando a validade preditiva adequada deste modelo animal (FREY *et al.*, 2006a; FREY *et al.*, 2006d). Não obstante, o modelo de d-ANF e modelos animais de transtornos mentais em geral possuem algumas limitações em sua validade de constructo (EL-MALLAKH *et al.*, 2006; KRISHNAN; NESTLER, 2010).

O mecanismo de ação da d-ANF, como visto na introdução, envolve um aumento na liberação de monoaminas - especialmente dopamina (DA) - por mecanismos que incluem a difusão de troca induzida por d-ANF, transporte reverso, o fenômeno de transporte do tipo canal, entre outros (FLECKENSTEIN *et al.*, 2007). Adicionalmente, um mecanismo pelo qual a metanfetamina, um composto muito similar à anfetamina, diminui a função do transportador de DA (TDA) está relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio uma vez que a exposição do TDA a essas moléculas pode alterar sua função (FLECKENSTEIN *et al.*, 1997; VOLZ; SCHENK, 2004). Portanto, um possível mecanismo de ação mais exato da d-ANF neste modelo animal pode ser o acúmulo de DA e espécies reativas associadas à mesma nas terminações neuronais (YAMATO *et al.*, 2010).

Fisiologicamente, a DA é metabolizada (Figura 16) pela monoamina oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido dihidroxifenilacético (BERMAN;

HASTINGS, 1999), bem como pode sofrer hidroxilação não enzimática na presença de Fe^{2+} e H_2O_2 , o que leva a formação de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (GRAHAM *et al.*, 1978). Ambas as vias podem causar disfunção celular devido a um desequilíbrio oxidativo. A toxicidade mediada pelo 6-OHDA inclui a inibição do complexo I mitocondrial (REES *et al.*, 2007), estresse do retículo endoplasmático (BERMAN; HASTINGS, 1999) e a ativação da glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) (OBATA, 2002). Esse mesmo composto pode também ser convertido em p-quinona, podendo ativar a via da caspase-8, o que leva à apoptose (STOKES *et al.*, 1999).

Figura 16 – Metabolismo da dopamina



Esquematisação do metabolismo da dopamina (BERMAN; HASTINGS, 1999; MEISER *et al.*, 2013; OBATA, 2002; REES *et al.*, 2007; STOKES *et al.*, 1999)

Adicionalmente, uma recente abordagem de integração com o envolvimento de pesquisa pré-clínica, genética, neuroimagem, farmacológica e domínios clínicos, levou à postulação da *síndrome de desregulação dopaminérgica* ao TAB (BERK *et al.*, 2007). O modelo propõe uma desregulação cíclica da transmissão quantitativa de DA no TAB, sendo a fase maníaca associada ao aumento da transmissão dopaminérgica e uma subsequente diminuição da mesma desencadeada pela hiporregulação de elementos chave regulatórios, como receptores pré- e pós-sinápticos. A hiper- e hiporregulação podem ser mediadas por

mecanismos homeostáticos endógenos, existindo também vulnerabilidades individuais aos mesmos, o que explica a grande variabilidade interindividual no curso desse transtorno (BERK *et al.*, 2010).

Após observar os resultados apresentados, considerar a postulada síndrome de desregulação dopaminérgica e o mecanismo de ação da anfetamina, infere-se que o modelo de mania induzida por d-ANF pode, realmente, ser indicado para avaliação pré-clínica de possíveis agentes com atividade antimaníaca.

O AAL é um composto naturalmente encontrado em plantas e animais e tem propriedades antioxidantes expressivas. Essa substância é intracelularmente reduzida a outro antioxidante, o ácido dihidrolipóico (DHLA), pela dihidrolipoamida desidrogenase mitocondrial dependente de NADH (SUZUKI *et al.*, 1991), o qual foi provado possuir capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica facilmente (FUCHS J., 1997). O AAL é um potente sequestrador de radicais livres que inibe a formação de H₂O₂ e radicais hidroxilas, eliminam produtos da peroxidação lipídica, quelam metais de transição redox-ativados (SUZUKI *et al.*, 1991), modulam os níveis de óxido nítrico no cérebro (GROSS; WOLIN, 1995) e participam da reciclagem de outros antioxidantes (por ex., GSH e ácido ascórbico), bem como induzem enzimas associadas a sintetizar glutathiona (PACKER *et al.*, 1995).

A produção de EROs é um fenômeno natural fisiológico. No entanto, quando em condições que os mecanismos naturais de defesas estão comprometidos (por ex., envelhecimento, depressão crônica, TAB), os tecidos com alta demanda de energia, como o cérebro, podem estar mais vulneráveis ao dano oxidativo, resultando em estados pró-inflamatórios (HOLMQUIST *et al.*, 2007). Como debatido extensivamente na introdução, baseado na premissa de que o AAL é um poderoso antioxidante, o mesmo oferece vantagens terapêuticas significantes como neuroprotetor para doenças neurodegenerativas (FUCHS J., 1997). Estudos pré-clínicos têm evidenciado efeitos importantes do AAL em modelos de transtornos neuropsiquiátricos, como Huntington (ANDREASSEN *et al.*, 2001), Alzheimer (QUINN *et al.*, 2007), déficits cognitivos relacionados ao envelhecimento (STOLL *et al.*, 1993), melhoramento da função mitocondrial (HAGEN *et al.*, 1999) e depressão (SALAZAR, 2000).

Recentes descobertas (DESLAURIERS *et al.*, 2011) indicam que o AAL diminui a expressão do receptor de dopamina D2 (DRD2) em culturas de células SH-SY5Y, portanto sugerindo que as condições oxidativas basais das células em cultura aumentam os níveis de DRD2 (HALLIWELL, 2003; LEIST *et al.*, 1996). Essa observação está de acordo com a noção de que um nível patofisiológico de EROs é necessário para a regulação adequada da função celular. É importante ressaltar que os DRD2 encontrados em estruturas subcorticais são os receptores mais importantes relacionados à hiperlocomoção (CHAVEZ *et al.*, 2009) induzida pela d-ANF e que os mesmos encontram-se alterados em pacientes bipolares (ZOU *et al.*, 2010). Adicionalmente, pesquisas anteriores inferiram que o AAL pode influenciar os níveis de DA (SANTOS *et al.*, 2010b). Nesse experimento, os resultados apresentados demonstraram que o AAL reduziu a hiperlocomoção induzida por d-ANF em ambos os tratamentos, reversão e prevenção. É possível que esses efeitos sejam parcialmente explicados pelo declínio nos níveis de DA ou DRD2 induzido pelo AAL.

Baseando-se nas propriedades antioxidantes do AAL, decidimos avaliar as alterações nas defesas antioxidantes (SOD e GSH), bem como a peroxidação lipídica em animais submetidos aos protocolos de prevenção e reversão nas áreas cerebrais a seguir: CPF, HC e CE. Essas áreas foram selecionadas pelo fato de mudanças em parâmetros de estresse oxidativo já terem sido observadas nas mesmas quando submetidas à exposição ao modelo animal de mania induzida por d-ANF (FREY *et al.*, 2006b; FREY *et al.*, 2006c). Em adição, aumentos na oxidação e nitração de proteínas mitocondriais (ANDREAZZA *et al.*) foram recentemente demonstrados no CPF *post mortem* de pacientes bipolares. Aliás, anormalidades funcionais nos sistemas frontoestriatais (MCINTOSH *et al.*, 2008) e no HC (FREY *et al.*, 2007b) foram também previamente evidenciadas em pacientes com TAB. Nas condições experimentais presentes, os resultados mostram que as alterações na atividade da SOD e nos níveis de GSH foram específicas para determinadas áreas cerebrais. Em relação à atividade da SOD no tratamento de prevenção, alterações foram observadas no CE e HC; o AAL 100 mg/kg foi capaz de prevenir a diminuição da atividade da SOD induzida por d-ANF na região do CE. Similarmente, no protocolo de reversão, ambas as doses de AAL usadas aumentaram a atividade da SOD no CE.

Em contraste, os níveis de GSH em ambos os protocolos variaram principalmente no HC. Nesta área cerebral, o AAL e o Li foram capazes de prevenir e reverter as alterações induzidas pela d-ANF. A SOD atua metabolizando o ânion superóxido (O_2^-) em excesso e

produzindo H_2O_2 . Carvalho e colaboradores (CARVALHO *et al.*, 2001) relataram uma diminuição na atividade da SOD no CE de ratos tratados com d-ANF (20mg/kg por 14 dias). Interessantemente, o agonista de DRD2, ropinirol, protegeu os neurônios estriatais dos ratos contra a toxicidade do 6-OHDA por aumentar a atividade da SOD e os níveis de GSH (IIDA *et al.*, 1999). O GSH, por outro lado, é a defesa antioxidante primária do cérebro. Reduções nos níveis de GSH já foram relatadas em pacientes bipolares (GAWRYLUK *et al.*, 2011) e em ratos após o tratamento com d-ANF (DEAN *et al.*, 2011). Portanto, o aumento no conteúdo de GSH principalmente no HC e da atividade da SOD predominantemente no CE podem estar relacionadas com o aumento das defesas antioxidantes induzido pela administração do AAL. É crível que diferentes defesas antioxidantes sejam ativadas em áreas distintas do cérebro para proteger contra o dano oxidativo induzido pela d-ANF (FREY *et al.*, 2006b).

A peroxidação lipídica é uma das maiores consequências do dano cerebral mediado por radicais livres (MECOCCI *et al.*, 1997). No presente estudo, a administração de d-ANF aumentou os níveis de MDA (um marcador de peroxidação lipídica) em todas as áreas cerebrais estudadas, enquanto o AAL e o Li foram capazes de prevenir e reverter essa alteração. De acordo, estudos anteriores relataram um aumento na peroxidação lipídica no modelo animal de mania induzida por d-ANF (FREY *et al.*, 2006b) nas mesmas regiões cerebrais. O dano oxidativo aos fosfolipídios de membrana leva a alteração da fluidez da mesma podendo levar a morte celular (MECOCCI *et al.*, 1997). Outra causa da mesma pela agressão oxidativa é a ativação de vias apoptóticas, o que pode resultar no prejuízo dos mecanismos de estabilização de humor (BERK *et al.*, 2011b). Portanto, a prevenção e reversão da peroxidação lipídica vistas após a coadministração de AAL com d-ANF sugerem que a redução do estresse oxidativo é parte do mecanismo de ação do AAL contra a hiperlocomoção induzida pela d-ANF.

Observamos que os efeitos do AAL nos parâmetros de estresse oxidativo foram comparáveis àqueles obtidos com o Li, com apenas três exceções: (i) no CE de animais submetidos aos protocolos de prevenção e reversão, o AAL, e não o lítio, preveniu e reverteu a alteração da atividade da SOD induzida pela d-ANF; (ii) apenas o Li preveniu as alterações na atividade da SOD induzidas pela d-ANF no HC dos animais tratados; (iii) o Li, mas não o AAL, aumentou os níveis de GSH no CPF. Diferenças na distribuição do AAL no cérebro podem explicar essas divergências (ARIVAZHAGAN; PANNEERSELVAM, 2002). Por

exemplo, seguido o tratamento crônico com AAL (100 mg/kg, i.p., por 7 e 14 dias), o conteúdo de lipoato foi maior no CE de ratos mais velhos (acima de 22 meses de idade) (ARIVAZHAGAN; PANNEERSELVAM, 2002). Portanto, é plausível que em condições em que o equilíbrio oxidativo encontra-se alterado (ex. envelhecimento e tratamento com d-ANF), os níveis de lipoato estejam aumentados principalmente no CE, oferecendo defesa antioxidante.

Esse experimento também quis determinar se os efeitos do AAL estariam relacionados com alterações nos níveis de BDNF no HC. A racionalização para essa hipótese foi baseada na evidência disponível que documenta concentrações periféricas anormais de neurotrofinas em indivíduos com TAB (POST, 2007b); a administração aguda (7 dias) de d-ANF em ratos é associada com a diminuição dos níveis de BDNF no HC (FREY *et al.*, 2006a); e que estabilizadores de humor podem alterar os níveis de neurotrofinas em pacientes e animais (FREY *et al.*, 2006a). Curiosamente, nossos resultados demonstraram que os níveis de BDNF foram restaurados para normalidade apenas no protocolo de reversão. Portanto, pode ser que os mecanismos por trás dos efeitos do AAL contra alterações comportamentais induzidas pela d-ANF estejam relacionados com mecanismos independentes do BDNF, como também indicam que pode haver uma padrão de resposta que relacione o tempo de tratamento com o ácido lipóico e alterações nos níveis de BDNF.

6 CONCLUSÃO

Similarmente ao lítio, o AAL reverteu e preveniu a hiperatividade induzida pela d-ANF; restaurou parâmetros de estresse oxidativo para níveis normais de forma área-específica para cada mecanismo antioxidante e reestabeleceu os níveis de BDNF no hipocampo no protocolo de reversão do modelo animal de mania aguda induzida por d-ANF. Os resultados referidos sugerem que o AAL tem um futuro potencial para o tratamento do TAB. Adicionalmente, os mesmos sustentam a hipótese de que os processos “neurotróficos” e de “estresse oxidativo” são relevantes para a expressão sintomática do TAB (BERK *et al.*, 2011b; POST, 2007b). Dado o fato de que o AAL é um cofator essencial para as enzimas mitocondriais e que a disfunção mitocondrial está implicada na patofisiologia do TAB (POST, 2007b), estudos futuros deveriam investigar os efeitos do AAL na função mitocondrial (ex. como um modulador da atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial). Uma vez que o AAL é um composto de fácil acesso e de tolerabilidade favorável em humanos (SHAY *et al.*, 2009), nossos dados fornecem uma lógica para o desenvolvimento de testes clínicos que avaliem os possíveis efeitos antimaníacos do AAL (isolado ou como tratamento adjunto).

7 REFERÊNCIAS

ABDUL, H. M.; BUTTERFIELD, D. A. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 3, p. 371-84, Feb 1 2007.

ACKENHEIL, M. Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis. **J Affect Disord**, v. 62, n. 1-2, p. 101-11, Jan 2001.

AKIBA, S.; MATSUGO, S.; PACKER, L.; KONISHI, T. Assay of protein-bound lipoic acid in tissues by a new enzymatic method. **Anal Biochem**, v. 258, n. 2, p. 299-304, May 1 1998.

ANDREASSEN, O. A.; FERRANTE, R. J.; DEDEOGLU, A.; BEAL, M. F. Lipoic acid improves survival in transgenic mouse models of Huntington's disease. **Neuroreport**, v. 12, n. 15, p. 3371-3, Oct 29 2001.

ANDREAZZA, A. C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B. N.; BOND, D. J.; KAPCZINSKI, F.; YOUNG, L. T.; YATHAM, L. N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **J Affect Disord**, v. 111, n. 2-3, p. 135-44, Dec 2008a.

ANDREAZZA, A. C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B. N.; STERTZ, L.; ZANOTTO, C.; RIBEIRO, L.; GIASSON, K.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; SALVADOR, M.; QUEVEDO, J.; GONCALVES, C. A.; KAPCZINSKI, F. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. **J Psychiatry Neurosci**, v. 33, n. 6, p. 516-24, Nov 2008b.

ANDREAZZA, A. C.; SHAO, L.; WANG, J. F.; YOUNG, L. T. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 360-8, Apr

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205-35, May 1973.

ARIVAZHAGAN, P.; PANNEERSELVAM, C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipids and membrane-bound ATPases in various brain regions of aged rats. **Journal of Anti-Aging Medicine**, v. 5, n. 4, p. 335-343, Win 2002.

ARIVAZHAGAN, P.; SHILA, S.; KUMARAN, S.; PANNEERSELVAM, C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. **Exp Gerontol**, v. 37, n. 6, p. 803-11, Jun 2002.

BEARDEN, C. E.; HOFFMAN, K. M.; CANNON, T. D. The neuropsychology and neuroanatomy of bipolar affective disorder: a critical review. **Bipolar Disord**, v. 3, n. 3, p. 106-50; discussion 151-3, Jun 2001.

BELMAKER, R. H. Bipolar disorder. **N Engl J Med**, v. 351, n. 5, p. 476-86, Jul 29 2004.

BERK, M.; CONUS, P.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A. C.; YUCEL, M.; WOOD, S. J.; PANTELIS, C.; MALHI, G. S.; DODD, S.; BECHDOLF, A.; AMMINGER, G. P.; HICKIE, I. B.; MCGORRY, P. D. From neuroprogression to neuroprotection: implications for clinical care. **Med J Aust**, v. 193, n. 4 Suppl, p. S36-40, Aug 16 2010.

BERK, M.; DODD, S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; MALHI, G. S.; BOURIN, M.; KAPCZINSKI, F.; NORMAN, T. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, n. 434, p. 41-9, 2007.

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A. C.; DEAN, O. M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YUCEL, M.; GAMA, C. S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHAES, P. V.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G. S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 3, p. 804-17, Jan 2011a.

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A. C.; DEAN, O. M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YUCEL, M.; GAMA, C. S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHAES, P. V.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G. S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation; oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, p. 804-17, Oct 8 2011b.

BERMAN, S. B.; HASTINGS, T. G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 73, n. 3, p. 1127-37, Sep 1999.

BHARAT, S.; COCHRAN, B. C.; HSU, M.; LIU, J.; AMES, B. N.; ANDERSEN, J. K. Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 4-5, p. 479-86, Oct 2002.

BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **Gen Pharmacol**, v. 29, n. 3, p. 315-31, Sep 1997.

BOTTLENDER, R.; RUDOLF, D.; STRAUSS, A.; MOLLER, H. J. Antidepressant-associated manifold states in acute treatment of patients with bipolar-I depression. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 248, n. 6, p. 296-300, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRUNELLO, N. Mood stabilizers: protecting the mood...protecting the brain. **J Affect Disord**, v. 79 Suppl 1, p. S15-20, Apr 2004.

CARREAU, J. P. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. **Methods Enzymol**, v. 62, p. 152-8, 1979.

CARVALHO, F.; FERNANDES, E.; REMIAO, F.; GOMES-DA-SILVA, J.; TAVARES, M. A.; BASTOS, M. D. Adaptative response of antioxidant enzymes in different areas of rat brain after repeated d-amphetamine administration. **Addict Biol**, v. 6, n. 3, p. 213-221, Jul 2001.

CHAVEZ, C.; GOGOS, A.; JONES, M. E.; VAN DEN BUUSE, M. Psychotropic drug-induced locomotor hyperactivity and prepulse inhibition regulation in male and female aromatase knockout (ArKO) mice: role of dopamine D1 and D2 receptors and dopamine transporters. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 206, n. 2, p. 267-79, Oct 2009.

DEAN, O. M.; VAN DEN BUUSE, M.; BERK, M.; COPOLOV, D. L.; MAVROS, C.; BUSH, A. I. N-acetyl cysteine restores brain glutathione loss in combined 2-cyclohexene-1-one and d-amphetamine-treated rats: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. **Neurosci Lett**, v. 499, n. 3, p. 149-53, Jul 25 2011.

DESLAURIERS, J.; LEFRANCOIS, M.; LAROUCHE, A.; SARRET, P.; GRIGNON, S. Antipsychotic-induced DRD2 upregulation and its prevention by alpha-lipoic acid in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Synapse**, v. 65, n. 4, p. 321-31, Apr 2011.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; SIMPSON, J. R., JR.; TODD, R. D.; REICH, T.; VANNIER, M.; RAICHLE, M. E. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 824-7, Apr 24 1997.

DUBOVSKY, S. L.; CHRISTIANO, J.; DANIELL, L. C.; FRANKS, R. D.; MURPHY, J.; ADLER, L.; BAKER, N.; HARRIS, R. A. Increased platelet intracellular calcium concentration in patients with bipolar affective disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 46, n. 7, p. 632-8, Jul 1989.

DUMAN, R. S. Synaptic plasticity and mood disorders. **Mol Psychiatry**, v. 7 Suppl 1, p. S29-34, 2002.

EDWARDS, D. J.; SPIKER, D. G.; NEIL, J. F.; KUPFER, D. J.; RIZK, M. MHPG excretion in depression. **Psychiatry Res**, v. 2, n. 3, p. 295-305, Jul 1980.

EL-MALLAKH, R. S.; DECKER, S.; MORRIS, M.; LI, X. P.; HUFF, M. O.; EL-MASRI, M. A.; LEVY, R. S. Efficacy of olanzapine and haloperidol in an animal model of mania. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 7, p. 1261-4, Sep 30 2006.

EL-MALLAKH, R. S.; EL-MASRI, M. A.; HUFF, M. O.; LI, X. P.; DECKER, S.; LEVY, R. S. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. **Bipolar Disord**, v. 5, n. 5, p. 362-5, Oct 2003.

ERSAHIN, M.; TOKLU, H. Z.; CETINEL, S.; YUKSEL, M.; ERZIK, C.; BERKMAN, M. Z.; YEGEN, B. C.; SENER, G. Alpha lipoic acid alleviates oxidative stress and preserves blood brain permeability in rats with subarachnoid hemorrhage. **Neurochem Res**, v. 35, n. 3, p. 418-28, Mar 2010.

FAUST, A.; BURKART, V.; ULRICH, H.; WEISCHER, C. H.; KOLB, H. Effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced diabetes and insulinitis in non-obese diabetic mice. **Int J Immunopharmacol**, v. 16, n. 1, p. 61-6, Jan 1994.

FERNANDES, B. S.; GAMA, C. S.; CERESER, K. M.; YATHAM, L. N.; FRIES, G. R.; COLPO, G.; DE LUCENA, D.; KUNZ, M.; GOMES, F. A.; KAPCZINSKI, F. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. **J Psychiatr Res**, v. 45, n. 8, p. 995-1004, Aug 2011.

FLECKENSTEIN, A. E.; METZGER, R. R.; BEYELER, M. L.; GIBB, J. W.; HANSON, G. R. Oxygen radicals diminish dopamine transporter function in rat striatum. **Eur J Pharmacol**, v. 334, n. 1, p. 111-4, Sep 3 1997.

FLECKENSTEIN, A. E.; VOLZ, T. J.; RIDDLE, E. L.; GIBB, J. W.; HANSON, G. R. New insights into the mechanism of action of amphetamines. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 47, p. 681-98, 2007.

FOUNTOULAKIS, K. N.; VIETA, E.; SANCHEZ-MORENO, J.; KAPRINIS, S. G.; GOIKOLEA, J. M.; KAPRINIS, G. S. Treatment guidelines for bipolar disorder: a critical review. **J Affect Disord**, v. 86, n. 1, p. 1-10, May 2005.

FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; CERESER, K. M.; MARTINS, M. R.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sci**, v. 79, n. 3, p. 281-6, Jun 13 2006a.

FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; KUNZ, M.; GOMES, F. A.; QUEVEDO, J.; SALVADOR, M.; GONCALVES, C. A.; KAPCZINSKI, F. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 283-5, Jan 30 2007a.

FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; NERY, F. G.; MARTINS, M. R.; QUEVEDO, J.; SOARES, J. C.; KAPCZINSKI, F. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. **Behav Pharmacol**, v. 18, n. 5-6, p. 419-30, Sep 2007b.

FREY, B. N.; MARTINS, M. R.; PETRONILHO, F. C.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. **Bipolar Disord**, v. 8, n. 3, p. 275-80, Jun 2006b.

FREY, B. N.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; MARTINS, M. R.; PETRONILHO, F. C.; BARDINI, K.; DAL-PIZZOL, F.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. **Neurochem Res**, v. 31, n. 5, p. 699-703, May 2006c.

FREY, B. N.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; MARTINS, M. R.; PETRONILHO, F. C.; BARDINI, K.; DAL-PIZZOL, F.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Effects of lithium and valproate

on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J Psychiatry Neurosci**, v. 31, n. 5, p. 326-32, Sep 2006d.

FUCHS J., P. L., ZIMMER G. Lipoic acid in health and disease. **New York: Marcel Dekker, Inc.**, 1997.

GAWRYLUK, J. W.; WANG, J. F.; ANDREAZZA, A. C.; SHAO, L.; YOUNG, L. T. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 14, p. 123-30, Jul 16 2011.

GESSA, G. L.; PANI, L.; SERRA, G.; FRATTA, W. Animal models of mania. **Adv Biochem Psychopharmacol**, v. 49, p. 43-66, 1995.

GOLDBERG, J. F.; HARROW, M. Consistency of remission and outcome in bipolar and unipolar mood disorders: a 10-year prospective follow-up. **J Affect Disord**, v. 81, n. 2, p. 123-31, Aug 2004.

GRAHAM, D. G.; TIFFANY, S. M.; BELL, W. R., JR.; GUTKNECHT, W. F. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. **Mol Pharmacol**, v. 14, n. 4, p. 644-53, Jul 1978.

GRANDE, I.; FRIES, G. R.; KUNZ, M.; KAPCZINSKI, F. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. **Psychiatry Investig**, v. 7, n. 4, p. 243-50, Dec 2010.

GROSS, S. S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 737-69, 1995.

HAGEN, T. M.; INGERSOLL, R. T.; LYKKESFELDT, J.; LIU, J.; WEHR, C. M.; VINARSKY, V.; BARTHOLOMEW, J. C.; AMES, A. B. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. **FASEB J**, v. 13, n. 2, p. 411-8, Feb 1999.

HAHN, C. G.; UMAPATHY; WANG, H. Y.; KONERU, R.; LEVINSON, D. F.; FRIEDMAN, E. Lithium and valproic acid treatments reduce PKC activation and receptor-G protein coupling in platelets of bipolar manic patients. **J Psychiatr Res**, v. 39, n. 4, p. 355-63, Jul 2005.

HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? **FEBS Lett**, v. 540, n. 1-3, p. 3-6, Apr 10 2003.

HERMANN, R.; NIEBCH, G.; BORBE, H. O.; FIEGER-BÜSCHGES, H.; RUUS, P.; NOWAK, H.; RIETHMÜLLER-WINZEN, H.; PEUKERT, M.; BLUME, H. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 167-174, 1996.

HOLMQUIST, L.; STUCHBURY, G.; BERBAUM, K.; MUSCAT, S.; YOUNG, S.; HAGER, K.; ENGEL, J.; MUNCH, G. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. **Pharmacol Ther**, v. 113, n. 1, p. 154-64, Jan 2007.

HUONG, N. T.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. **Biol Pharm Bull**, v. 21, n. 9, p. 978-81, Sep 1998.

IIDA, M.; MIYAZAKI, I.; TANAKA, K.; KABUTO, H.; IWATA-ICHIKAWA, E.; OGAWA, N. Dopamine D2 receptor-mediated antioxidant and neuroprotective effects of ropinirole, a dopamine agonist. **Brain Res**, v. 838, n. 1-2, p. 51-9, Aug 14 1999.

KAPCZINSKI, F.; FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; CUNHA, A. B.; POST, R. M. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 30, n. 3, p. 243-5, Sep 2008a.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; AL., E. **Transtorno Bipolar: Teoria e clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KAPCZINSKI, F.; VIETA, E.; ANDREAZZA, A. C.; FREY, B. N.; GOMES, F. A.; TRAMONTINA, J.; KAUER-SANT'ANNA, M.; GRASSI-OLIVEIRA, R.; POST, R. M. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 4, p. 675-92, 2008b.

KAUER-SANT'ANNA, M.; TRAMONTINA, J.; ANDREAZZA, A. C.; CERESER, K.; DA COSTA, S.; SANTIN, A.; YATHAM, L. N.; KAPCZINSKI, F. Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology. **Bipolar Disord**, v. 9 Suppl 1, p. 128-35, Jun 2007.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E. E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593-602, Jun 2005.

KESSLER, R. C.; MCGONAGLE, K. A.; ZHAO, S.; NELSON, C. B.; HUGHES, M.; ESHLEMAN, S.; WITTCHEN, H. U.; KENDLER, K. S. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 8-19, Jan 1994.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **Am J Psychiatry**, v. 167, n. 11, p. 1305-20, Nov 2010.

KULOGLU, M.; USTUNDAG, B.; ATMACA, M.; CANATAN, H.; TEZCAN, A. E.; CINKILINC, N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Cell Biochem Funct**, v. 20, n. 2, p. 171-5, Jun 2002.

KUNUGI, H.; HATTORI, M.; KATO, T.; TATSUMI, M.; SAKAI, T.; SASAKI, T.; HIROSE, T.; NANKO, S. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. **Mol Psychiatry**, v. 2, n. 6, p. 457-62, Oct-Nov 1997.

LEIST, M.; RAAB, B.; MAURER, S.; ROSICK, U.; BRIGELIUS-FLOHE, R. Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. **Free Radic Biol Med**, v. 21, n. 3, p. 297-306, 1996.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

MACHADO-VIEIRA, R.; KAPCZINSKI, F.; SOARES, J. C. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 209-24, Mar 2004.

MACZUREK, A.; HAGER, K.; KENKLIES, M.; SHARMAN, M.; MARTINS, R.; ENGEL, J.; CARLSON, D. A.; MUNCH, G. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 13-14, p. 1463-70, Oct-Nov 2008.

MANJI, H. K.; QUIROZ, J. A.; PAYNE, J. L.; SINGH, J.; LOPES, B. P.; VIEGAS, J. S.; ZARATE, C. A. The underlying neurobiology of bipolar disorder. **World Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. 136-46, Oct 2003.

MCINTOSH, A. M.; WHALLEY, H. C.; MCKIRDY, J.; HALL, J.; SUSSMANN, J. E.; SHANKAR, P.; JOHNSTONE, E. C.; LAWRIE, S. M. Prefrontal function and activation in bipolar disorder and schizophrenia. **Am J Psychiatry**, v. 165, n. 3, p. 378-84, Mar 2008.

MECOCCI, P.; BEAL, M. F.; CECCHETTI, R.; POLIDORI, M. C.; CHERUBINI, A.; CHIONNE, F.; AVELLINI, L.; ROMANO, G.; SENIN, U. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. **Mol Chem Neuropathol**, v. 31, n. 1, p. 53-64, May 1997.

MEISER, J.; WEINDL, D.; HILLER, K. Complexity of dopamine metabolism. **Cell Commun Signal**, v. 11, n. 1, p. 34, 2013.

MIJNHOUT, G. S.; ALKHALAF, A.; KLEEFSTRA, N.; BILO, H. J. Alpha lipoic acid: a new treatment for neuropathic pain in patients with diabetes? **Neth J Med**, v. 68, n. 4, p. 158-62, Apr 2010.

MILITAO, G. C.; FERREIRA, P. M.; DE FREITAS, R. M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 56, n. 1, p. 16-20, Jan 2010.

MILLER, C. J.; JOHNSON, S. L.; EISNER, L. Assessment Tools for Adult Bipolar Disorder. **Clin Psychol (New York)**, v. 16, n. 2, p. 188-201, Jun 1 2009.

NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H.; BUNCAN, M.; DUMAN, R. S.; GRESHENFELD, H. K.; HEN, R.; KOESTER, S.; LEDERHENDLER, I.; MEANEY, M.; ROBBINS, T.; WINSKY, L.; ZALCMAN, S. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503-28, Sep 15 2002.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 10, p. 1161-9, Oct 2010.

OBATA, T. Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. **J Neural Transm**, v. 109, n. 9, p. 1159-80, Sep 2002.

PACKER, L.; TRITSCHLER, H. J.; WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. **Free Radic Biol Med**, v. 22, n. 1-2, p. 359-78, 1997.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic Biol Med**, v. 19, n. 2, p. 227-50, Aug 1995.

PEDERZOLLI, C. D.; ROSA, A. P.; DE OLIVEIRA, A. S.; COELHO, J. G.; BECKER DDA, L.; DALAZEN, G. R.; MORAES, T. B.; DUTRA-FILHO, C. S. Neuroprotective role of lipoic acid against acute toxicity of N-acetylaspartic acid. **Mol Cell Biochem**, v. 344, n. 1-2, p. 231-9, Nov 2010.

PEREZ, J.; TARDITO, D.; MORI, S.; RACAGNI, G.; SMERALDI, E.; ZANARDI, R. Abnormalities of cAMP signaling in affective disorders: implication for pathophysiology and treatment. **Bipolar Disord**, v. 2, n. 1, p. 27-36, Mar 2000.

POST, R. M. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicality, and tolerance phenomena. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 31, n. 6, p. 858-73, 2007a.

POST, R. M. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. **J Psychiatr Res**, v. 41, n. 12, p. 979-90, Dec 2007b.

POST, R. M.; WEISS, S. R. Emergent properties of neural systems: how focal molecular neurobiological alterations can affect behavior. **Dev Psychopathol**, v. 9, n. 4, p. 907-29, Fall 1997.

QUINN, J. F.; BUSSIÈRE, J. R.; HAMMOND, R. S.; MONTINE, T. J.; HENSON, E.; JONES, R. E.; STACKMAN, R. W., JR. Chronic dietary alpha-lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. **Neurobiol Aging**, v. 28, n. 2, p. 213-25, Feb 2007.

RAJKOWSKA, G.; HALARIS, A.; SELEMON, L. D. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. **Biol Psychiatry**, v. 49, n. 9, p. 741-52, May 1 2001.

RANJEKAR, P. K.; HINGE, A.; HEGDE, M. V.; GHATE, M.; KALE, A.; SITASAWAD, S.; WAGH, U. V.; DEBSIKDAR, V. B.; MAHADIK, S. P. Decreased antioxidant enzymes and

membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. **Psychiatry Res**, v. 121, n. 2, p. 109-22, Dec 1 2003.

REES, J. N.; FLORANG, V. R.; ANDERSON, D. G.; DOORN, J. A. Lipid peroxidation products inhibit dopamine catabolism yielding aberrant levels of a reactive intermediate. **Chem Res Toxicol**, v. 20, n. 10, p. 1536-42, Oct 2007.

ROCK, C. O. Opening a new path to lipoic acid. **J Bacteriol**, v. 191, n. 22, p. 6782-4, Nov 2009.

SALAZAR, M. R. Alpha lipoic acid: a novel treatment for depression. **Med Hypotheses**, v. 55, n. 6, p. 510-2, Dec 2000.

SANTOS, I. M.; DE FREITAS, R. L.; SALDANHA, G. B.; TOME ADA, R.; JORDAN, J.; DE FREITAS, R. M. Alterations on monoamines concentration in rat hippocampus produced by lipoic acid. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 68, n. 3, p. 362-6, Jun 2010a.

SANTOS, I. M.; FREITAS, R. L.; SALDANHA, G. B.; TOME ADA, R.; JORDAN, J.; FREITAS, R. M. Alterations on monoamines concentration in rat hippocampus produced by lipoic acid. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 68, n. 3, p. 362-6, Jun 2010b.

SEDDON, K.; NUTT, D. Pharmacological treatment of bipolar disorder. **Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. 305-308, 2007.

SEDLAK, J.; L, H. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. **Endocrinol Exp**, v. 16, n. 2, p. 103-9, Jun 1982.

SERBINOVA, E.; KHWAJA, S.; REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Thiocctic acid protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused Langendorff heart. **Free Radic Res Commun**, v. 17, n. 1, p. 49-58, 1992.

SHAY, K. P.; MOREAU, R. F.; SMITH, E. J.; SMITH, A. R.; HAGEN, T. M. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 10, p. 1149-60, Oct 2009.

SMITH, A. R.; SHENVI, S. V.; WIDLANSKY, M.; SUH, J. H.; HAGEN, T. M. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p. 1135-46, May 2004.

STOKES, A. H.; HASTINGS, T. G.; VRANA, K. E. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. **J Neurosci Res**, v. 55, n. 6, p. 659-65, Mar 15 1999.

STOLL, S.; HARTMANN, H.; COHEN, S. A.; MULLER, W. E. The potent free radical scavenger alpha-lipoic acid improves memory in aged mice: putative relationship to NMDA receptor deficits. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, n. 4, p. 799-805, Dec 1993.

SULZER, D.; SONNERS, M. S.; POULSEN, N. W.; GALLI, A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. **Prog Neurobiol**, v. 75, n. 6, p. 406-33, Apr 2005.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin Chem**, v. 34, n. 3, p. 497-500, Mar 1988.

SUZUKI, Y. J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. **Free Radic Res Commun**, v. 15, n. 5, p. 255-63, 1991.

SWANN, A. C.; KOSLOW, S. H.; KATZ, M. M.; MAAS, J. W.; JAVAID, J.; SECUNDA, S. K.; ROBINS, E. Lithium carbonate treatment of mania. Cerebrospinal fluid and urinary monoamine metabolites and treatment outcome. **Arch Gen Psychiatry**, v. 44, n. 4, p. 345-54, Apr 1987.

SWANN, A. C.; SECUNDA, S.; DAVIS, J. M.; ROBINS, E.; HANIN, I.; KOSLOW, S. H.; MAAS, J. W. CSF monoamine metabolites in mania. **Am J Psychiatry**, v. 140, n. 4, p. 396-400, Apr 1983.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 1, p. 125-32, Jan 2000.

VOLZ, T. J.; SCHENK, J. O. L-arginine increases dopamine transporter activity in rat striatum via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. **Synapse**, v. 54, n. 3, p. 173-82, Dec 1 2004.

VYTHILINGAM, M.; HEIM, C.; NEWPORT, J.; MILLER, A. H.; ANDERSON, E.; BRONEN, R.; BRUMMER, M.; STAIB, L.; VERMETTEN, E.; CHARNEY, D. S.; NEMEROFF, C. B.; BREMNER, J. D. Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 12, p. 2072-80, Dec 2002.

WANG, H. Y.; FRIEDMAN, E. Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorder brains. **Biol Psychiatry**, v. 40, n. 7, p. 568-75, Oct 1 1996.

YAMATO, M.; KUDO, W.; SHIBA, T.; YAMADA, K. I.; WATANABE, T.; UTSUMI, H. Determination of reactive oxygen species associated with the degeneration of dopaminergic neurons during dopamine metabolism. **Free Radic Res**, v. 44, n. 3, p. 249-57, Mar 2010.

YATHAM, L. N.; KENNEDY, S. H.; SCHAFFER, A.; PARIKH, S. V.; BEAULIEU, S.; O'DONOVAN, C.; MACQUEEN, G.; MCINTYRE, R. S.; SHARMA, V.; RAVINDRAN, A.; YOUNG, L. T.; YOUNG, A. H.; ALDA, M.; MILEV, R.; VIETA, E.; CALABRESE, J. R.; BERK, M.; HA, K.; KAPCZINSKI, F. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2009. **Bipolar Disord**, v. 11, n. 3, p. 225-55, May 2009.

YOUNG, J. W.; HENRY, B. L.; GEYER, M. A. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1263-84, Oct 2011.

ZOU, Y. F.; WANG, F.; FENG, X. L.; LI, W. F.; TIAN, Y. H.; TAO, J. H.; PAN, F. M.; HUANG, F. Association of DRD2 gene polymorphisms with mood disorders: A meta-analysis. **J Affect Disord**, Dec 2 2010.