



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ANA ISABELLE DE GOIS QUEIROZ**

**MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO PELO INIBIDOR DO  
TRANSPORTADOR DE DOPAMINA GBR 12909: ESTUDO DE ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS E PREVENÇÃO/REVERSÃO  
PELA MINOCICLINA**

**2017**

## **ANA ISABELLE DE GOIS QUEIROZ**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

Q42m Queiroz, Ana Isabelle de Gois.

Modelo animal de mania induzido pelo inibidor do transportador de dopamina GBR 12909: Estudo de alterações comportamentais e neuroquímicas e prevenção/reversão pela minociclina / Ana Isabelle de Gois Queiroz. – 2017.

137 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Transtorno Bipolar. 2. Mania. 3. GBR12909. 4. Minociclina. 5. Lítio. I. Título.

CDD 615.1

---

**ANA ISABELLE DE GOIS QUEIROZ**

**MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO PELO INIBIDOR DO  
TRANSPORTADOR DE DOPAMINA GBR 12909: ESTUDO DE ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS E PREVENÇÃO/REVERSÃO  
PELA MINOCICLINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Fábio Klamt  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Profa. Dra. Samira Valvassori  
Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

---

Prof. Dr. David Freitas de Lucena  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra Mariana Lima Vale  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Dedico essa tese a  
minha mãe, meu exemplo de  
amor, força, serenidade e  
superação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, pela compreensão e serenidade para concluir este trabalho.

A minha família que está comigo em todas as situações, com quem posso contar nos momentos bons e ruins. Pelo estímulo e exemplo de ter a educação como alicerce de vida. Ao meu irmão pela pessoa especial, e inspiradora, por caminhar nesse trajeto de vida comigo. As minhas tias e tios, primas e primos que sempre estiveram disponíveis e compreendendo as ausências pela falta de tempo. A minha avó Terezinha que partiu em 2015, mas lutando durante 7 meses para viver e mostrando através do seu exemplo que cada dia e cada coisa que passamos é importante, tem significado e experiência, ela um dos meus maiores referenciais de alegria, força, dedicação e esperança. Ao meu pai que ao seu jeito nesse período contribuiu para que eu crescesse como ser humano. Sem as experiências vividas com eles extra o ambiente da pós-graduação eu não seria quem sou hoje.

A minha orientadora professora Dra. Danielle Macêdo pela oportunidades, transmissão de conhecimento, exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa de forma admirável, gratidão pela convivência durante a pós-graduação e que com certeza me fazem não ser mais a mesma Isabelle de quando iniciei.

A todos os professores do grupo de pesquisa do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em especial, professora Cléa, professor David, professora Sylvania.

As pessoas importantes e especiais que conheci durante esse tempo e que me ajudaram cada um de sua forma e que sei que sozinha não conseguiria terminar esse trabalho. Por ordem de contato desde o mestrado, agradeço a Nathália Liberato que me apresentou a professora Danielle, a Vlândia por poder ter acompanhado seus primeiros experimentos, a Greicy e Júlia pela companhia nas pesquisas sobre o Transtorno Bipolar, aos IC's Maíra e Michel, a Rafaela Cordeiro pela ajuda nos experimentos, a Tatiane Araújo pela companhia nas pesquisas e amizade, Adriana, Camila, Eliclécio e Taciana pela força, alegria, estímulo e ajuda imprescindível nessa reta final, ao IC Adriano pela ajuda nos experimentos. A Roberta e Mariana Feitosa pelo exemplo de alegria e empenho nos trabalhos de pesquisa. A Patrícia Xavier, Viviane Thomás, Bruna Teles pelos bons

momentos e as experiências que ficarão sempre conosco. Aos meus colegas pós graduandos e bolsistas de iniciação científica pela parceria, e auxílio nos experimentos e na divisão de conhecimento.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelo aprendizado e auxílio nas tarefas acadêmicas.. As técnicas do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Vila, Lena e Luciana, pela presença sempre solícita.

À Universidade Federal do Ceará, por ter feito parte da minha graduação, mestrado, e agora doutorado em Farmacologia.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!!

*“Quem elegeu a busca, não pode recusar a travessia”.*  
Guimarães Rosa



## **Modelo animal de mania induzido pelo inibidor do transportador de dopamina GBR 12909: estudo de alterações comportamentais e neuroquímicas e prevenção/reversão pela minociclina**

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno crônico e debilitante e que embora afete em torno de 2% da população mundial, seu tratamento farmacológico ainda é limitado. Se caracteriza pela oscilação entre as fases de mania e depressão. Sua fisiopatologia se caracteriza por alterações oxidativas, em neurotransmissores como a dopamina e neuroinflamatórias, dentre outras. Neste contexto, se faz necessário modelos animais que consigam mimetizar as diferentes fases do TAB. No seguinte estudo um modelo animal de mania foi induzido pela administração aguda ou repetida de GBR12909 (10 mg/kg, i.p.), um inibidor do transportador de dopamina (DAT), buscando pesquisar alterações comportamentais e neuroquímicas. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da Minociclina (MINO) nas doses de 25 e 50mg/kg, uma tetraciclina que apresenta efeitos neuroprotetores, e dos estabilizadores de humor Lítio (Li) 47,5mg/kg ou Valproato (VAL) 200mg/kg neste modelo. O presente trabalho foi dividido em três capítulos: o primeiro capítulo avaliou o curso temporal de alterações comportamentais e oxidativas (em áreas cerebrais relevantes para o TAB) induzidas pela administração aguda do GBR12909, bem como o efeito preventivo de fármacos estabilizadores de humor. O segundo capítulo avaliou os efeitos preventivos/terapêuticos da MINO no comportamento de hiperlocomoção induzido por GBR12909 baseado no possível papel de mecanismos antioxidantes e neurotróficos neste efeito. O terceiro capítulo avaliou o efeito da MINO nas alterações comportamentais relacionadas à memória de trabalho (teste de Y-maze), interação social e ansiedade (labirinto em cruz), além de também investigar a participação de mecanismos hipocampais como ativação de micróglia e expressão do DAT nos animais submetidos à administração repetida de GBR12909. Foi observado que a administração aguda de GBR12909 induziu hiperlocomoção 2 e 24 h após sua administração. Os níveis de GSH diminuíram no hipocampo e no estriado 2, 4, 8 e 12 h pós-GBR12909. O aumento da peroxidação lipídica foi observado 2 e 12h pós-GBR12909 no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e estriado. O Li preveniu a hiperlocomoção horizontal e vertical 2h pós-GBR12909, enquanto o VAL impediu as alterações de hiperlocomoção vertical. Ambos os fármacos protegeram contra alterações pró-oxidativas. Com a administração repetida de GBR12909 foi observada hiperlocomoção, comportamento de risco, alterações de memória e interação social que foram prevenidas pelos estabilizadores de humor e por ambas as doses de MINO. Os comportamentos de hiperlocomoção e déficit de memória de trabalho foram revertidos por todos os fármacos testados. Li, VAL ou MINO foram mais efetivos na reversão das alterações de GSH (Glutathiona Reduzida). Quanto à peroxidação lipídica, MINO foi mais eficaz na prevenção e reversão no hipocampo, enquanto que Li e o VAL impediram esta alteração no estriado e córtex pré-frontal. Li, VAL e MINO 25 reverteram a diminuição dos níveis de BDNF induzidos pela administração repetida de GBR12909. Na avaliação por imunoblotting do DAT e IBA (Ionizing Calcium-Binding Adaptor Molecule), observou-se uma redução na expressão proteica do DAT em todos os grupos tratados com GBR12909, exceto o controle. Já o IBA apresentou um aumento significativo no hipocampo dos animais submetidos à administração repetida de GBR12909, enquanto apenas a MINO 50 foi capaz de prevenir significativamente esta alteração. Portanto, conclui-se que a administração de GBR12909 mimetiza alterações comportamentais e neuroquímicas semelhantes à mania que podem ser prevenidas ou revertidas pelos estabilizadores de humor Li e Val. A MINO se mostrou uma estratégia eficaz no controle das alterações induzidas pelo GBR12909, principalmente na dose de 50 mg/kg. Logo, nossos dados fornecem suporte pré-clínico ao desenho de novos estudos pré-clínicos e clínicos para uma melhor investigação dos efeitos antimaníacos da MINO.

Palavras-chave: Transtorno Bipolar; Mania; GBR12909; Minociclina; Lítio; Valproato

## **Mouse Model of Mania Induced by GBR12909, a Dopamine Transporter Inhibitor: Behavioral and Neurochemical Alterations Study and Prevention / Reversal by Minocycline**

### **ABSTRACT**

Bipolar Disorder (BD) is a chronic and debilitating illness that affects around 2% of the world population. Even though it has a relatively high prevalence rate, its pharmacological treatment is still limited. This disorder is mainly characterized by the oscillation between phases of mania and depression, episodes which can only be mimicked in animal models separately once the cycling between them is a parameter that cannot yet be reproduced. This difficulty is due to the existence of restrictions to the mechanisms of action of the drugs used in BD animal models as well as to the subjectivity of this particular parameter. BD's pathophysiology is characterized by oxidizing factors, alterations in neurotransmitters such as dopamine, and inflammatory activity, among others. Therefore, it is essential to have animal models that are able to mimic the clinical contexts of mania and depression as well as new substances that have activity in their pathophysiological pathways. The present study used a mouse model of mania induced by a dopamine transporter inhibitor (GBR12909) in order to investigate the behavioral, pharmacological and neurochemical alterations caused by the acute and sub-chronic administration of GBR12909 10mg / kg. These treatments aimed to mimic the pathophysiology of mania, thus being characterized as an animal model of mania. The study had 10 groups in which the animals were treated with either Minocycline (Mino), a tetracycline that presents clinical response in psychiatric disorders, at doses of 25 or 50mg / kg, Lithium (Li) 47.5mg / kg, Valproate (VAL) 200mg / kg or saline (control group). Based on the protocols followed during the research, experiments were divided into three chapters: (1) addressed the administration of GBR12909 as an animal model of mania, the temporal course of behavioral and oxidative alterations in specific brain areas, and the effects of mood stabilizing drugs, (2) focused on minocycline antimanic activity presented in the animal model of mania suggested and its possible role in antioxidant and neurotrophic mechanisms, (3) studied the influence of minocycline in behavioral changes (social interaction test, y-maze, plus-maze, social interaction) and pathophysiology through the evaluation of specific expression markers of intracellular hippocampal proteins (dopamine transporter - DAT and Iba, microglia marker) extracted from the animals submitted to the animal model of mania. Results indicated that GBR12909 caused alterations in locomotor activity 2h and 24h after its administration. Glutathione levels (GSH) decreased in the hippocampus and striatum at the time points of 2, 4, 8 and 12 h. An increase in lipid peroxidation was detected at the time points of 2 and 12 h in all brain areas studied. Li prevented alterations in horizontal and vertical hyperlocomotion 2h post-GBR12909, while VAL prevented vertical hyperlocomotion changes. Both drugs prevented pro-oxidative alterations. Subsequent evaluation of the prevention and reversal protocols showed that repeated administration of GBR12909 induced a hyperlocomotion increase, risk behavior, and memory, social interaction and cognition alterations. These changes were avoided by the administration of the mood stabilizers and both Mino doses. Hyperlocomotion and memory alterations were reversed by all drugs analyzed. Li, VAL or Mino were more effective in reversing GSH changes. As for lipid peroxidation, Mino was more effective in preventing and reversing its increase in the hippocampus whereas Li and VAL prevented it in the striatum and prefrontal cortex. Li, VAL and Mino25 reversed the decrease in BDNF levels induced by GBR12909. As for the quantification of DAT and IBA markers by immunoblotting, no expression of DAT was observed in any of the treated groups except saline. However, Li and Mino prevention groups showed a tendency of their IBA results going towards the same as of the control group, but without statistical significance. In conclusion, the administration of GBR12909 mimicked the manic phenotype, and Li, Val and Mino prevented and reversed manic-like behavior and acted in part on the neurochemical pathways of GBR12909-treated mice. Consequently, our data provides preclinical support for the design of trials investigating the possible antimanic effects of Mino in GBR12909 induction model or other manic type animal models.

Key-words: Bipolar disorder; Mania; GBR12909; Minocycline; Lithium; Valproate

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Critérios para validação de um modelo animal de doença.....	26
Quadro 2 -. Efeitos colaterais do Lítio e seu manejo .....	32
Quadro 3 – Resumo dos resultados encontrados no Protocolo I .....	116
Quadro 4 – Resumo dos resultados encontrados no Protocolo II.....	117
Quadro 5 – Resumo dos resultados encontrados no Protocolo III.....	119

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Episódios de humor no transtorno bipolar .....	21
Figura 2-	Entendimento das relações entre mediadores de alostase envolvidos na resposta ao estresse no TAB.....	22
Figura 3-	Modulação da neuroplasticidade, neurogênese e sobrevivência celular por meio da modulação da atividade da GSK – 3 $\beta$ .....	24
Figura 4-	Ciclo proposto para o dano no TAB pelos múltiplos episódios .....	25
Figura 5-	Efeito clínico da Minociclina com atividade antibiótica e não antimicrobiana.....	38
Figura 6-	Estrutura química da tetraciclina e da minociclina .....	38
Figura 7-	Protocolo experimental I (a) .....	43
Figura 8-	Protocolo experimental I (b) .....	44
Figura 9-	Protocolo experimental II .....	45
Figura 10-	Protocolo experimental III.....	46
Figura 11-	Desenho representativo para o aparato do teste do campo aberto.....	48
Figura 12 -	Representação do aparato utilizado no teste de interação social.....	49
Figura 13-	Desenho representativo do aparato para o teste labirinto em Y.....	50
Figura 14-	Desenho representativo do aparato para o teste plus maze.....	51
Figura 15 -	Aparato utilizado para o teste do estímulo olfativo aversivo (teste do odor do gato) .....	53
Figura 16 -	Atividade Locomotora no teste de campo aberto dos animais administrados com 10 mg / kg de GBR 12909 avaliados nos pontos de tempo de 2, 4, 8, 12 e 24 h após a administração da droga ( A – atividade horizontal (crossings) e B atividade vertical rearing).....	61

Figura 17 -	Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) de animais controle e tratados com GBR 12909 avaliados nos pontos de tempo de 2, 4, 8, 12 e 24 h após administração de fármaco.....	63
Figura 18 -	Níveis de MDA no córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) de animais controle e tratados com GBR 12909 avaliados nos pontos de tempo de 2, 4, 8, 12 e 24 h após administração de fármaco.....	65
Figura 19 -	Atividade Locomotora no teste de campo aberto de animais pré- tratados durante 3 dias com Litio ou Valproato e posterior administração aguda de 10 mg / kg de GBR 12909 2h após o 3º dia de tratamento (A – crossings : atividade horizontal e B – rearing: atividade vertical ).....	67
Figura 20 -	Níveis reduzidos de glutathiona (GSH) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais pré-tratados durante 3 dias com lítio (Li) ou valproato (VAL) e posterior administração aguda de 10 mg / kg de GBR 12909 2h após o 3º dia de tratamento.....	69
Figura 21 -	Níveis de Malonaldeído (MDA) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais pré-tratados durante 3 dias com lítio (Li) ou valproato (VAL) e posterior administração aguda de 10 mg / kg de GBR 12909 2h após o 3º dia de tratamento.....	70
Figura 22 -	Efeito da Minociclina 25 mg / kg (Mino25) ou 50 mg / kg (Mino50) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão da hiperlocomoção (A - número de crossings e B número de rearings) induzidos pelo administração repetida de GBR-12909 em camundongos.....	78
Figura 23 -	Efeito de Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão do comportamento de risco no teste de odor de gato induzidos pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos.....	81
Figura 24 -	Efeito da Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão das alterações em níveis reduzidos de glutathiona (GSH) induzidas pela administração repetida de GBR 12909 em camundongos.....	84
Figura 25 -	Efeito da Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão das alterações na peroxidação lipídica induzidas pela administração repetida de GBR - 12909 em camundongos.....	86

Figura 26 -	Efeito da Minociclina (Mino) e estabilizadores do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão das alterações no fator neurotrófico derivado do cérebro do hipocampo (BDNF) no protocolo de prevenção e reversão induzido pela administração repetida de GBR-12909.....	88
Figura 27 -	Efeito de Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão nas alterações de interação social induzidas pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos.....	98
Figura 28 -	Efeito da Minociclina (Mino) e de drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (Val) na prevenção ou reversão de alterações na memória executiva induzida pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos no teste de Y-maze.....	100
Figura 29 -	Efeito de Minociclina (Mino) e de drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão de alterações no número de entradas nos braços abertos induzidas pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos.....	102
Figura 30 -	Efeito de Minociclina (Mino) e de drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão no percentual do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) induzido pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos no teste de labirinto em cruz elevado.....	104
Figura 31 -	Efeito da Minociclina e da droga estabilizadora do humor, lítio (Li) na prevenção ou reversão das alterações na expressão do transportador de dopamina (DAT) no hipocampo em animais sob o protocolo de prevenção e reversão induzido pela administração repetida de GBR-12909.....	105
Figura 32	Efeito da Minociclina (Mino50) e a droga estabilizadora do humor, lítio (Li) na prevenção ou reversão das alterações na expressão do IBA no hipocampo em animais sob o protocolo de prevenção e reversão induzido pela administração repetida de GBR-12909.....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
5-HT	Serotonina
AKT	Serina-treonina quinase
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CEPA	Comissão de ética em pesquisa animal
CID-10	Código internacional de doenças
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CK1	Creatina quinase 1
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
DNase	Desoxirribonuclease
DA	Dopamina
D1	Receptor D1 da dopamina
DAT	Transportador de dopamina
D2	Receptor D2 da dopamina
DRD2	Receptor D2 da dopamina
DSM-V	Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais V
Eaat1	Transportador de glutamato
EPM	Erro padrão da média
<i>et al</i>	E colaboradores
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GSK3 $\beta$	Glicogênio sintetase kinase 3 $\beta$
GC	Guanilato ciclase
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GBR12909	Bloqueador de transportador de dopamina
GABA	Ácido $\gamma$ -amino-butírico
GSH	Glutationa reduzida
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HPG	Eixo Hipófise-Pituitária-gonadal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
IDO	Enzima indoleamina 2,3-dioxigenase
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
Li	Carbonato de Lítio

LDX	Dimesilato de Lisdexanfetamina
M	Molar
M2	Receptor muscarínico do tipo 2
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
Min	Minuto
Mino	Minociclina
mL	Mililitro
NSC	Núcleo supraquiasmático
N	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NEED	N-(1-naftil) etilenodiamina-dicloridrato
NFκB	Fator de transcrição nuclear-Kb
NO2-	Nitrito
NO	Óxido nítrico
Nox	Metabólitos de óxido nítrico
NP-40	Nonidet p-40
PBS	Tampão fosfato-salino
Pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
Rnase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TH	Tirosina-hidroxilase
TAB	Transtorno afetivo bipolar
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBST	Tampão salina Tris-hcl suplementado com Tween 20
VAL	Valproato de Sódio
V	Volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Zn <sup>2+</sup>	Zinco



## SUMÁRIO

### 1 INTRODUÇÃO

1.1	Transtorno Afetivo Bipolar .....	19
1.1.1	Fisiopatologia do TAB .....	21
1.2	Modelos animais tipo Mania do Transtorno Bipolar.....	24
1.2.1	Modelo animal de mania induzido por GBR 12909.....	26
1.3	Tratamento farmacológico do transtorno bipolar .....	27
1.3.1	Carbonato de Lítio.....	28
1.3.2	Valproato de Sódio.....	32
1.4	Redirecionamento de fármacos para o tratamento do TAB .....	33
1.5	Minociclina nos transtornos psiquiátricos.....	35
1.6	Relevância e Justificativa .....	38

### 2 OBJETIVOS

2.1	Objetivo geral.....	40
2.2	Objetivos Específicos.....	40

### 3 METODOLOGIA

3.1	Animais .....	41
3.2	Drogas .....	41
3.3	Desenho Experimental .....	41

PROTOCOLO I - GBR 12909 como um modelo animal de mania: curso temporal de alterações comportamentais e oxidativas em áreas cerebrais e efeito de fármacos estabilizadores do humor .....

PROTOCOLO II - Efeito da minociclina no modelo de mania induzido por GBR12909 em camundongos: papel de mecanismos antioxidantes e neurotróficos .....

PROTOCOLO III: avaliação de memória e de comportamentos relacionados a ansiedade em animais submetidos ao modelo de mania induzido pela administração repetida de GBR12909 e tratados com estabilizadores do humor e minociclina.....

3.4	Testes comportamentais .....	47
3.4.1	Campo Aberto .....	47
3.4.2	Teste de interação social .....	48
3.4.3	Teste do labirinto em Y (Y-maze).....	49
3.4.4	Labirinto em cruz elevado ( <i>Plus Maze</i> ) .....	50
3.4.5	Teste do odor do gato .....	51
3.5	Medição dos níveis séricos de lítio .....	52
3.6	Determinação de parâmetros de estresse oxidativo .....	52
3.6.1	Preparação de tecido.....	52
3.6.2	Determinação de Glutathione Reduzida (GSH) .....	53
3.6.3	Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	53
3.7	Dosagem de BDNF hipocampal .....	53
3.8	Determinação dos marcadores DAT e IBA através da técnica de Western Blotting .....	54
3.8.1	Extração de proteínas .....	55
3.8.2	Método Bradford para dosagem de proteína .....	55
3.8.3	Western Blotting .....	55

3.9	Análise estatística.....	56
4	Capítulo I – GBR 12909 como um modelo animal de mania: curso temporal de alterações comportamentais e oxidativas em áreas cerebrais e efeito de fármacos estabilizadores do humor	
4.1	Avaliação do comportamento no campo aberto – <i>crossings e rearings</i> .....	58
4.2	Avaliação dos níveis de Glutathione Reduzida (GSH) .....	60
4.3	Avaliação dos níveis de Malondialdeído.....	62
4.4	Determinação da atividade preventiva do lítio e valproato em parâmetros comportamentais da administração aguda de GBR 12909.....	64
4.5	Avaliação dos níveis de GSH em animais submetidos às estratégias de prevenção ...	66
4.6	DISCUSSÃO.....	69
4.6.1	Curva dose-resposta das alterações comportamentais e de estresse oxidativo induzidas por GBR 12909 .....	69
4.6.2	Alterações oxidativas comportamentais e cerebrais relacionadas ao tempo induzidas pela GBR 12909.....	70
4.6.3	Determinação da atividade preventiva de lítio e valproato na administração aguda de GBR 12909 como modelo animal de mania .....	73
5	Capítulo II - Efeito da minociclina no modelo de mania induzido por GBR12909 em camundongos: papel de mecanismos antioxidantes e neurotróficos	
5.1	Minociclina previne e reverte hiperlocomoção e comportamento exploratório induzido por GBR12909 .....	75
5.2	A minociclina previne e reverte o aumento do comportamento de risco induzido pelo GBR12909.....	77
5.3	Níveis de Glutathione.....	80
5.4	Níveis de peroxidação lipídica .....	83
5.5	Níveis de BDNF .....	84
5.6	Discussão.....	87
5.6.1	Alterações comportamentais de hiperatividade e comportamento de risco induzidas por GBR12909 e efeitos da mino .....	87
5.6.2	Estresse oxidativo e níveis de bdnf e sua relação com os efeitos da Mino .....	92
5.6.3	A inibição do DAT, o consequente aumento da dopamina e de alterações oxidativas.....	91
6.0	Capítulo III - Avaliação da memória de trabalho, comportamentos relacionados a ansiedade e avaliação da expressão protéica de DAT e IBA em animais submetidos ao modelo de mania induzido pela administração repetida de GBR12909 e tratados com estabilizadores do humor e minociclina	
6.1	A Minociclina preveniu e reverteu as alterações causadas pelo GBR 12909 em camundongos avaliados no teste de interação social.....	94
6.2	A Minociclina preveniu as alterações espontâneas no teste de Y-maze de animais tratados com GBR 12909.....	96
6.3	A Minociclina conseguiu prevenir e reverter a alteração no número de entradas nos braços abertos de camundongos no teste do labirinto em cruz elevado .....	98
6.4	A Minociclina conseguiu prevenir e reverter o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado .....	100

6.5	Expressão das proteínas DAT e IBA1 no hipocampo dos animais tratados com GBR12909.....	102
6.5.1	Expressão da proteína DAT .....	102
6.5.2	Expressão da proteína IBA1 .....	102
6.6	Discussão.....	104
6.6.1	Alterações cognitivas, de ansiedade, comportamento de risco e interação social induzidas por GBR12909 e efeitos da Mino .....	104
6.6.2	Minociclina previne alterações induzidas por GBR12909 no teste de y-maze .....	104
6.6.3	Minociclina previne alterações induzidas por GBR12909 no teste de interação social .....	105
6.6.4	Minociclina previne alterações induzidas por GBR12909 no teste de plus-maze .....	105
6.6.5	Análise da expressão protéica do transportador de dopamina (DAT) nos grupos controle e tratados com Minociclina 50mg e Lítio 47,5mg prevenção e reversão induzidos por GBR 12909 .....	106
6.6.6	Análise da expressão protéica do do IBA nos grupos controle e tratados com Minociclina 50mg e Lítio 47,5mg prevenção e reversão induzidos por GBR 12909 .....	108
<b>7.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>		
	Mino preveniu e reverteu as alterações causadas pelo GBR 12909.....	
	Expressão da proteína DAT .....	
	Expressão da proteína IBA1 .....	
<b>8.0. CONCLUSÃO</b>		
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>117</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>131</b>
	Apêndice a - Declaração aceite do comitê de ética .....	131
	Apêndice b - Abstract do trabalho publicado na revista Metabolic Brain Disease - 2015.....	132
	Apêndice c - Abstract do trabalho publicado no Journal of Affective Disorders - 2017.....	133

## INTRODUÇÃO

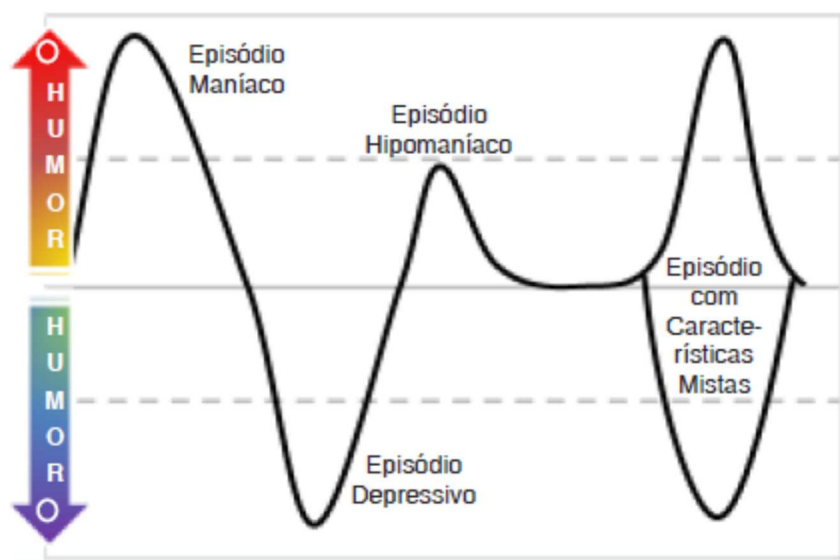
### 1.1 Transtorno Afetivo Bipolar

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno crônico e debilitante. Se caracteriza pela alternância de humor, transitando entre episódios de mania e depressão (VALVASSORI et al., 2016). Afeta aproximadamente 2% da população mundial e apresenta prevalência igual em ambos os sexos, raça ou condição geográfica (MUNEER, 2017). É uma das condições psiquiátricas com mais impacto na vida social, laboral e psicológica dos pacientes portadores deste diagnóstico (MILIENNE-PETIOT et al., 2017a). O início dos sintomas costuma ocorrer na idade adulta em torno da segunda década de vida, com consequências impactantes não só ao paciente, mas também à sociedade, com altos níveis de inabilidade funcional a baixa qualidade de vida, com influência em custos socioeconômicos, devido a pouca capacidade produtiva relacionada a alternância de humor do paciente interferindo em sua estabilidade na rotina de trabalho. Dentre os transtornos psiquiátricos, está associado também a risco de mortalidade prematura e complicações associadas a comorbidades clínicas e alta prevalência de suicídio (BLANCO et al., 2017).

A principal característica clínica do TAB que o distingue de outros transtornos psiquiátricos como esquizofrenia e depressão maior é sua natureza cíclica entre as fases de mania e depressão. Os sintomas da mania se caracterizam pela hiperatividade, irritabilidade, insônia, grandiosidade e em algumas vezes sintomas semelhantes aos psicóticos. A depressão é associada a sintomas aparentemente opostos aos da mania, como o humor triste, baixa autoestima, insônia, letargia e anedonia (ENKHUIZEN et al., 2016).

De acordo com o Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM-V) existem três tipos de TAB – o tipo I, II e o ciclotímico -, sendo essa classificação feita a partir da observação da ocorrência de quadros depressivos, maníacos e/ou hipomaníacos (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2017). O TAB tipo I tem como fundamental particularidade no curso clínico a presença de um ou mais episódios maníacos ou episódios mistos. Pacientes bipolares do tipo I também podem apresentar um ou mais episódios depressivos ao longo da vida. Em alguns casos, existem períodos de humor normal entre esses episódios. Já o TAB tipo II caracteriza-se pela presença de um episódio depressivo e pelo menos um episódio hipomaníaco. Os pacientes comumente

regressam à função usual entre os episódios. E por fim, o transtorno ciclotímico, o qual envolve múltiplos períodos de sintomas hipomaníacos e de sintomas depressivos. Na ciclotimia os sintomas, tanto os hipomaníacos quanto os depressivos, têm número, gravidade, abrangência ou duração insuficientes para a satisfação dos critérios para o diagnóstico do TAB do tipo I ou do tipo II ( AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2016). Já o quadro conhecido como “com características mistas” se aplica aos estados em que há a ocorrência concomitante de sintomas maníacos e depressivos, embora estes sejam vistos como polos opostos do humor (Figura 1).



**Figura 1: Episódios de humor no transtorno bipolar** (adaptado de BOSAIPO; JURUENA, 2017)

Uma meta-análise incluindo 5836 indivíduos com TAB tipo-I e TAB tipo-II com cerca de 70% dos pacientes com TAB tipo-I e 80% daqueles com TAB tipo-II indicou que estes sofreram pelo menos um episódio de alternância de humor subsequente após 4 anos, com um tempo médio de 1,7 anos para recaída após um episódio no TAB tipo-I, e 0,8 anos em TAB tipo-II (AMANN et al., 2017).

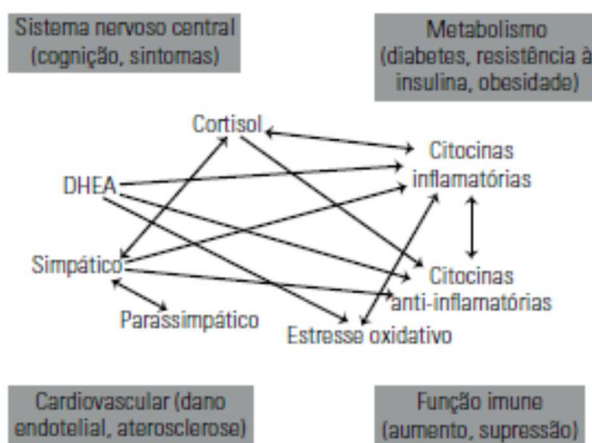
Essas alterações de humor no paciente com TAB se refletem nas limitações no âmbito comportamental, psíquico, cognitivo, afetivo, social e biológico, pois interferem na sua vida como também na vida dos familiares que o acompanham na vivência destes problemas, já que o paciente pode, em muitas das vezes, precisar de cuidado nas suas atividades de rotina devido a baixa autonomia nas habilidades individuais. Essas dificuldades podem intervir nas relações conjugais, habilidades parentais, bem como ter

consequências também na vida dos indivíduos que os acompanham neste trajeto (ÇUHADAR et al., 2015).

Dentre as causas etiológicas do TAB estão as interferências de exposição ambiental, incluindo eventos estressantes de vida e/ou abuso ou dependência de substâncias químicas, além do forte impacto da predisposição genética. Alguns genes podem ser significativos apenas quando certos fatores externos são estimulados e levados em consideração (MISIAK et al., 2017).

### 1.1.1 Fisiopatologia do TAB

A fisiopatologia do TAB envolve desde alterações nos níveis de neurotransmissores como dopamina e glutamato como a relação com estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, de neuroplasticidade, variações pró-inflamatórias, além da predisposição genética. Todos esses fatores em conjunto contribuem para o aumento da carga alostática e, conseqüentemente, para a progressão do transtorno, condições clínicas mais críticas e intervenção farmacológica ainda mais significativa. A carga alostática se refere ao termo alostase, o qual indica efeitos nocivos do estresse crônico sobre o tecido nervoso e o corpo como um todo. Além da própria resposta do organismo buscando se adaptar a mudanças metabólicas, imunológicas, de controle energético, hormonais e neurohumorais (Figura 2), fazendo com que a progressiva ativação deste mecanismo se reflita de forma cumulativa gerando a chamada carga alostática (KAPCZINSKI et al., 2008a).

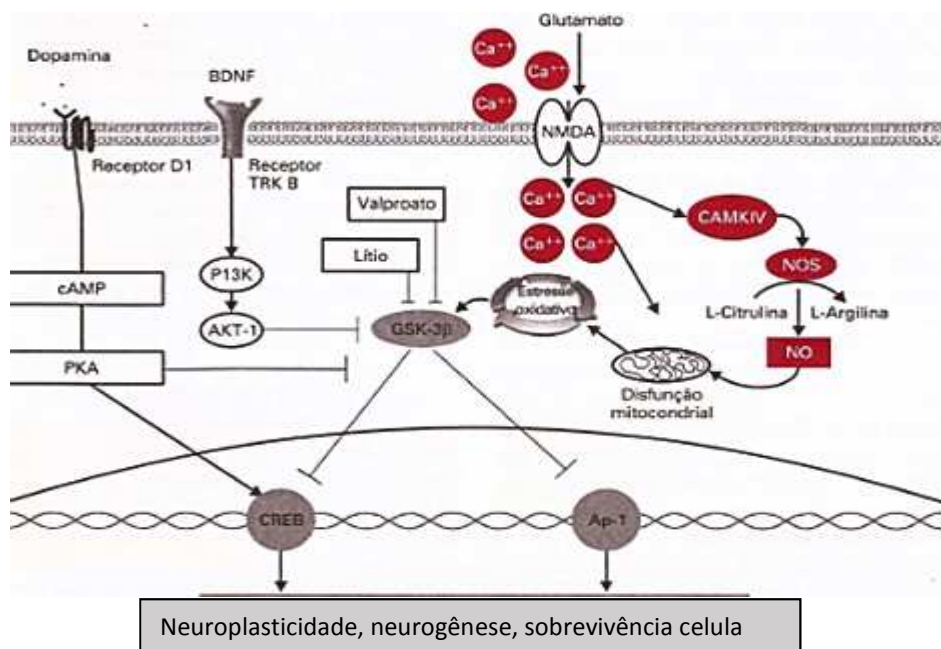


**Figura 2** – Entendimento das relações entre mediadores de alostase envolvidos na resposta ao estresse no TAB (MAGALHÃES; FRIES; KAPCZINSKI, 2012)

No que se refere ao processo de desregulação na via do TAB, estudos indicam desregulação nos níveis de dopamina (DA) no episódio de mania do transtorno, através de alterações significativas nos receptores dopaminérgicos em áreas cerebrais como hipocampo, corpo estriado, córtex pré frontal e vermis cerebelar (BERK et al., 2007) (MINICHINO et al., 2014) (DE QUEIROZ et al., 2018). Esse aumento irregular dos níveis de DA é uma das fontes do aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), interferindo no balanço oxidativo em marcadores como GSH, bem como na peroxidação lipídica com o composto malondialdeído (MDA) (FREY et al., 2006a). O estresse oxidativo causa prejuízo ao DNA com danos aos telômeros que, diminuídos, podem acelerar a morte celular e o envelhecimento dos indivíduos portadores do transtorno (FREY et al., 2007), bem como causa diminuição da neuroplasticidade e um aumento nos níveis intracelulares de cálcio responsivos ao estresse oxidativo, além da expressão de genes moduladores da cadeia transportadora de elétrons com a potencial disfunção mitocondrial e sua relação em estimular a produção excessiva de EROs (QUIROZ et al., 2008). Já as alterações do sistema glutamatérgico estão relacionadas a neurotoxicidade pela estimulação do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  através da hiperestimulação dos canais iônicos, bem como a disfunção mitocondrial e a uma incapacidade desta de tamponar o excesso de  $\text{Ca}^{+2}$ . (BLACKER et al., 2017) (Figura 3). Além da crise energética que pode alterar o gradiente de  $\text{Na}^{+}$  necessário para a captação de glutamato pelos astrócitos e ocasionar um transporte reverso, causando efluxo do estoque de glutamato astrocitário.

No contexto da sinalização intracelular na fisiopatologia do TAB, estudos indicam alterações na atividade das proteínas G em áreas cerebrais como o córtex pré-frontal. A ativação de proteínas G desencadeia uma sinalização intracelular através de segundos mensageiros, proteínas quinase e outros efetores. Dentre as vias de sinalização com maior evidência no TAB, estão a via do GSK3 – B e do fosfatidilinositol (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001). A proteína GSK3 – B está envolvida em diversos processos que regulam a atividade celular, como complexos protéicos que dão sustentabilidade para a estrutura da célula e fatores de transcrição celular como o CREB (*cAMP responde element binding*) estando, dessa forma, ligada a capacidade de alterar a plasticidade neuronal, crescimento dendrítico, e na modificação da plasticidade sináptica (DOBLE; WOODGETT, 2003) e seu importante papel nos processos de sinalização irregular em processos patológicos, principalmente na apoptose neuronal e na morte celular, estando associada à fisiopatologia de transtornos neuropsiquiátricos como

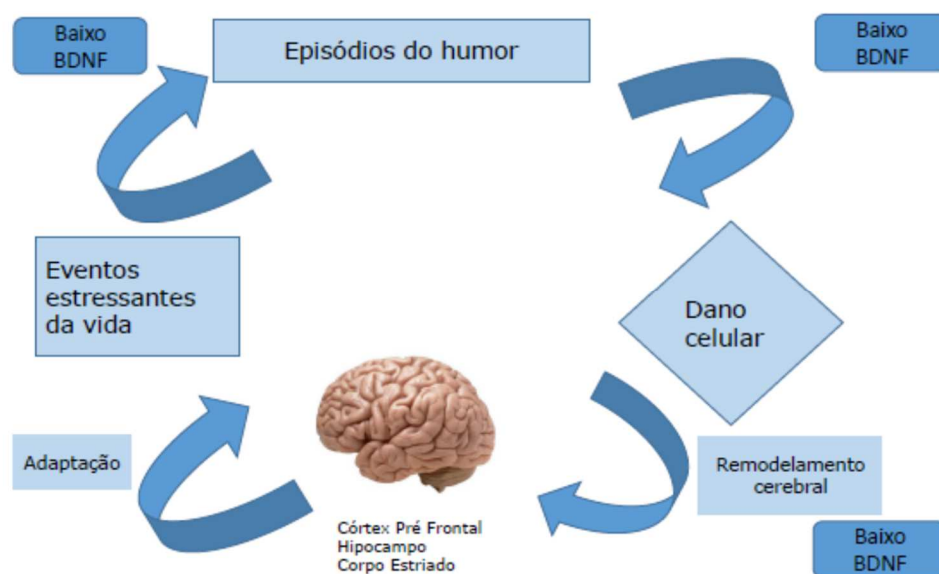
sua relação com o estresse oxidativo e outras alterações no TAB (VALVASSORI et al., 2017). Sabe-se que estabilizadores do humor como carbonato de Lítio (Li) e valproato (VAL) utilizados como primeira estratégia terapêutica no TAB, atuam inibindo a GSK-3 $\beta$ , reforçando seu papel na fisiopatologia do TAB (DE SOUSA et al., 2015). De fato, atuar em vias de prevenção da progressão do transtorno, como assim atuam os antioxidantes, previne-se também, em consequência a desregulação celular ativada pelo excesso de GSK-3 $\beta$ , reforçando também a importância de fármacos com atividade no início do processo do TAB (BROGI et al., 2017).



**Figura 3** – Modulação da neuroplasticidade, neurogênese e sobrevivência celular por meio da modulação da atividade da GSK – 3 $\beta$  (Adaptado de KAPCZINSKI, QUEVEDO et al, 2009)



Nesse sentido, é importante destacar que para simular as alterações observadas no TAB é preciso utilizar modelos animais que simulem cada vez melhor o transtorno, levando em consideração, portanto, os critérios de face, preditivo e de constructo dos modelos animais (MACÊDO et al., 2013). Partindo desse princípio, é importante salientar que o tratamento inadequado do TAB, predispõe a uma piora progressiva no quadro e consequências clínicas na cognição, memória e menor resposta ao tratamento farmacológico. Fatos que podem acontecer por influências no estilo de vida ou contato com situações de estresse, podendo levar um ciclo (Figura 4) em que os episódios de humor influenciados por eventos estressantes podem causar redução dos níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) e repercutir em dano celular com remodelamento cerebral em áreas como córtex pré-frontal, hipocampo e corpo-estriado e posterior adaptação, mas que com contato novamente com eventos estressores pode levar ao processo de neuroprogressão (BERK et al., 2011), fato este que deve ser estudado em protocolos de pesquisa pré-clínica e clínica visando o reforço da necessidade de prevenção e adesão ao tratamento para evitar a piora do quadro clínico do TAB.



**Figura 4.** Ciclo proposto para o dano no TAB pelos múltiplos episódios. ( Adaptado de Kapczinski, Quevedo et al, 2009).

Frente a todos os impactos que esse transtorno apresenta na vida do paciente, é inquestionável a necessidade de tratamento farmacológico, embora a escolha do medicamento seja complexa e envolva estratégias distintas nos diferentes estágios da doença: mania, depressão e eutímia (CHENIAUX, 2011), o que será abordado em seção

posterior. Portanto, todo o conjunto de sinais e sintomas que envolve esse transtorno se caracteriza como um grave problema de saúde pública e indicando assim a necessidade de permanente investigação de suas condições clínicas, fisiopatológicas e farmacológicas, o que vem sendo feito através de modelos animais.

## 1.2 Modelos animais tipo Mania do Transtorno Bipolar

Embora o TAB se apresente como um grande problema de saúde pública, seu arsenal terapêutico é limitado e, portanto, apresenta a necessidade do estudo de novas substâncias e alvos terapêuticos. Para isso, é necessário que modelos animais robustos se estabeleçam para que através deles, se possa avaliar critérios semelhantes aos que envolvem a fisiopatologia do transtorno e sua resposta a tratamentos já estabelecidos. Esses modelos devem atender três conjuntos de critérios nomeados de face, constructo e preditivos. A validade de face refere-se à capacidade do modelo de imitar os sintomas do transtorno no humano, enquanto a validade de constructo é o potencial do modelo para replicar correlações fisiopatológicas encontrada na desordem humana. Finalmente, os medicamentos convencionais utilizados para tratar o transtorno são utilizados para verificar seu potencial de prevenir e / ou reverter as alterações induzidas no modelo para atribuir sua validade preditiva (MACÊDO et al., 2013).

<b>CRITÉRIOS PARA VALIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA</b>	
<b>FACE</b>	Capacidade do modelo de mimetizar o comportamento apresentado pelo humano com a doença;
<b>CONSTRUCTO</b>	Capacidade do modelo de mimetizar sintomas fisiopatológicos apresentados pelo humano com a doença;
<b>PREDITIVO</b>	Capacidade do modelo de responder aos tratamentos preconizados como padrão para a determinada doença;

**Quadro 1:** Elaborado pela autora

O TAB se manifesta nos pacientes de forma cíclica entre as fases de mania e depressão, entretanto, na grande maioria dos modelos animais, esses períodos são

observados de forma separada, já que ainda praticamente nenhum modelo conseguiu mimetizar esse estado subjetivo do transtorno. Nesse contexto os modelos animais simulando de forma distinta a depressão e mania são mais comuns. No presente estudo, trabalhamos com um modelo animal de mania induzido por GBR12909 que será relatado mais à frente.

Nesse sentido, a literatura científica indica que os modelos animais de mania mais consistentes são baseados no estado hiperdopaminérgico subjacente à mania, como o modelo induzido pela administração repetida de d-anfetamina, reconhecido como modelo “padrão-ouro”. Este modelo trouxe evidências importantes sobre a implicação da dopamina (DA), do estresse oxidativo, neurotrofinas e alterações mitocondriais na fisiopatologia da mania (FREY et al., 2006b) (VALVASSORI et al., 2010). Notavelmente, o estresse oxidativo está sendo implicado na fisiopatologia, bem como na neuroprogressão do TAB (BERK et al., 2011).

O modelo de mania induzido por D-anfetamina foi primeiramente proposta pela coadministração de clordiazepóxido-dexanfetamina (DAVIES et al., 1974) e depois pela administração de 1,5 mg / kg de d-anfetamina (CAPPELIEZ; MOORE, 1990). Recentemente, este modelo enfrenta restrições burocráticas e de acesso devido ao alto potencial de abuso de d-anfetamina (RUSH et al., 2001), o que limita a aquisição desse medicamento para fins de pesquisa. Como uma tentativa para garantir a manutenção deste modelo, recentemente nosso grupo propôs o uso do dimesilato de lisdexamfetamina (LDX), um pró-fármaco de d-anfetamina (MACÊDO et al., 2013) na indução do modelo animal tipo mania, o que vem sendo reproduzido por alguns grupos de pesquisa (EGER et al., 2016).

### **1.2.1 Modelo animal de mania induzido por GBR 12909**

Conforme citado anteriormente, os modelos animais de mania são de suma importância para a pesquisa de novas vias envolvidas na sua gênese bem como na descoberta de inovações no tratamento farmacológico do TAB. E, apesar da etiologia e da fisiopatologia da mania ainda permanecerem com conhecimento limitado, o aumento da neurotransmissão dopaminérgica se apresenta como um aspecto neurobiológico central subjacente a este estado de humor (BERK et al., 2007). Evidências convincentes apoiaram o envolvimento de expressão anormal do transportador de dopamina (DAT) na

neurobiologia do TAB. É notável que o polimorfismo de nucleotídeos no gene do DAT são significativamente prevalentes em pacientes com TAB (PINSONNEAULT et al., 2011<sup>a</sup>). Além disso, estudos de vias genéticas tendem a associar variantes no gene DAT1 humano ao aumento de susceptibilidade ao TAB (GREENWOOD et al., 2006<sup>a</sup>). Algumas dessas variantes, como rs27072 C> T, têm importantes consequências funcionais na homeostase da DA, como demonstrado pela redução da expressão de DAT na superfície celular de estudo com cultura de células (HORSCHITZ et al., 2005) (PINSONNEAULT et al., 2011<sup>a</sup>). Animais com deleção genética de DAT (DAT-KO) (BARR et al., 2004) ou com redução da expressão de DAT (DAT-KD) (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011) apresentam traço hiperdopaminérgico e alterações comportamentais marcantes que se assemelham a mania em testes comportamentais de avaliação de locomoção em roedores.

Com base nas evidências acima mencionadas e o envolvimento de DAT na susceptibilidade ao TAB, a administração de GBR12909 [1- {2- [bis- (4-fluorofenil) metoxi] -etil} -4- (3-fenilpropil) piperazina] foi proposta no início desta década como um modelo farmacológico viável para indução da mania. O GBR 12909 é um inibidor do DAT de longa duração, com alta afinidade e um rápido início de ação. Importante ressaltar que o modelo de mania induzido por GBR12909 é baseado na etiologia do TAB, em que os polimorfismos no DAT humano foram associados ao endofenótipo bipolar (GREENWOOD et al., 2006) (PINSONNEAULT et al., 2011a). A administração aguda de GBR12909 em roedores induziu várias características do comportamento semelhante à da mania, como hiperatividade e exploração aumentada (YOUNG et al., 2010a), bem como impulsividade e comportamento de risco (J. et al., 2013). Até o momento, a validade de face deste modelo de mania foi avaliado pela determinação da hiperlocomoção imediatamente após a administração do GBR12909 (YOUNG et al., 2010a). A validade preditiva deste modelo foi determinado pelo uso dos medicamentos estabilizadores do humor como valproato (VAL) (VAN ENKHUIZEN et al., 2013) e lítio (Li) na reversão de efeitos induzidos por GBR12909 (QUEIROZ et al., 2015) e a validade de constructo pela sua ação como inibidor do DAT e estimulação do estado hiperdopaminérgico. De maneira geral, o uso do inibidor seletivo de DAT, GBR12909, emergiu como um modelo animal com validade adequada para a mania apresentando um grande potencial para a triagem de novos medicamentos eficazes para o tratamento do TAB. Vale destacar que a maioria dos grupos de pesquisa utiliza a administração aguda do GBR12909 como modelo de mania.

O estudo do modelo animal tipo mania induzido por GBR12909 busca contribuir com a investigação de vias fisiopatológicas do TAB e também como via para descoberta de novas substâncias com potencial farmacológico para esse transtorno.

### **1.3 Tratamento farmacológico do transtorno bipolar**

O tratamento farmacológico para o TAB tem papel determinante e inquestionável, e é realizado, tanto agudo quanto profilaticamente, principalmente, com estabilizadores do humor. Entretanto, uma grande quantidade dos pacientes tem recorrência de episódios de alteração do humor durante a vida, mesmo em uso da medicação adequada. Estudos demonstraram que 40% dos pacientes em tratamento para o TAB apresentaram recaídas em um ano e 73% apresentaram recaídas em cinco anos. Sabe-se que as recaídas pioram a evolução do transtorno, aumentando a ocorrência de novos episódios, diminuindo o intervalo entre estes e piorando o atividade psicossocial (VIETA; SANCHEZ-MORENO, 2008).

Nas últimas décadas, a preocupação com a farmacoterapia para o TAB aumentou significativamente devido as limitações existentes relacionadas a resposta ao tratamento. De fato, o fármaco de primeira escolha, o lítio, está associado a efeitos colaterais sérios que interferem na rotina do paciente de forma complexa e onerosa (CIPRIANI et al., 2011) (YILDIZ et al., 2015). Além disso, nenhum fármaco provou eficácia em todas as fases do TAB (SMITH et al., 2007). Portanto, o uso de modelos animais com validade preditiva devem, em última instância, ajudar no desenvolvimento de novas formas de tratamento, seguras e potencialmente efetivas para este transtorno complexo (LOGAN; MCCLUNG, 2016).

O presente estudo escolheu para efeito de comparação com a atividade da minociclina (MINO) no modelo animal de mania induzido pelo inibidor do transporte de dopamina, GBR12909, o carbonato de lítio (Li) e o valproato de sódio (VAL). Lítio, protótipo para o tratamento do TAB como estabilizador do humor (KETTER et al., 2016) e Valproato, um anticonvulsivante que vem sendo prescrito para o TAB em substituição ao Li ou, adicionado a ele, e que apresenta resposta clínica principalmente para pacientes com ciclagem rápida. (MORENO et al., 2004).

### 1.3.1 Carbonato de Lítio

A utilização terapêutica inicial do lítio em 1840, na forma de carbonato, designava-se ao tratamento da gota e das patologias consideradas na época associadas ao excesso de ácido úrico no organismo. A hipótese para essa indicação terapêutica procedeu da observação de que o carbonato de lítio diluía o ácido úrico em estudos *in vitro*. Desde então, o uso do lítio se ampliou, tornando-se recomendado, mesmo sem fundamento científico, para o tratamento de diversas enfermidades e como promotor de saúde. Entretanto, surgiram muitos casos de toxicidade e o lítio permaneceu negligenciado até as observações de John Frederick Joseph Cade, na década de 1940. Cade julgava que os quadros de pacientes com mania provinham de alterações na concentração de ácido úrico no organismo dos portadores, e assim realizou o primeiro estudo do efeito terapêutico de lítio no controle agudo da mania. Encontrou um efeito positivo nos 10 portadores de mania em que testou a nova medicação (ZUNG; MICHELON; CORDEIRO, 2010) e, desde então, o Li continua a ser o melhor tratamento estabelecido a longo prazo para o TAB. E embora seu uso já venha há mais de 50 anos, a eficácia vem de ensaios clínicos em que o Li foi incluído como um comparador ativo. Possui atividade terapêutica no risco ao suicídio em torno de 50% em pacientes com TAB, entretanto, os benefícios do Li são limitados frente aos efeitos colaterais e ao seu baixo índice terapêutico (GEDDES; MIKLOWITZ, 2013).

Embora sua indicação terapêutica para o TAB seja bem-conceituada, seu mecanismo de ação não é totalmente compreendido. Seus efeitos farmacológicos conhecidos incluem a inibição da glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), enzima que participa de muitos processos homeostáticos mas que no TAB apresenta-se alterada, regulação de neurotrofinas e do receptor de ácido amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), entre outros efeitos, (GIDEONS et al., 2017), os quais refletem na sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-apoptótica, (JORNADA et al., 2011) (DA-ROSA et al., 2012) (VALVASSORI et al., 2017), relevantes na atividade molecular como estabilizador do humor.

Dentre as atividades conhecidas e relevantes no mecanismo de ação do TAB estão seu papel como antioxidante e como inibidor da enzima GSK3 $\beta$ . Como antioxidante para o TAB é reconhecido em diversos estudos através da análise de sua atividade em

parâmetros de enzimas antioxidantes como a glutatona reduzida (GSH) e os níveis de malonaldeído (MDA), produto da peroxidação lipídica e da superóxido dismutase (SOD) (CUI et al., 2007) (VALVASSORI et al., 2015), indicando a relação das espécies reativas de oxigênio (EROS) com a via de indução de morte celular no TAB bem como com a desregulação em vias de fosforilação como a da GSK3 $\beta$ . Ao inibir a GSK3 $\beta$ , fator central no seu mecanismo de ação e, de fato, a sua atividade na estabilização do humor, devido a sua capacidade de se ligar a essa proteína pela competição com Mg<sup>2+</sup> ao sítio de ligação da GSK3 $\beta$ . Além disso, o Li também aumenta a fosforilação da GSK3 $\beta$ , atuando nesse ponto como um mecanismo de amplificação para a inibição direta desta proteína nos níveis terapêuticos deste estabilizador do humor. A importância da inibição da GSK3 $\beta$  nos transtornos de humor foi verificada em modelos animais usando camundongos knockin de GSK3 $\beta$ , os quais expõem aumento da hiperatividade locomotora induzida por anfetamina com e aos comportamentos semelhantes a depressão induzidos pelo estresse. Esse fato demonstra que uma ativação anormal da GSK3 $\beta$ , pode aumentar susceptibilidade a ambos os pólos apresentados em transtornos bipolares, reforçando que a atividade desenfreada da GSK3 $\beta$  pode contribuir para mecanismos patológicos envolvidos no transtorno bipolar. Em contrapartida, é importante observar a concentração terapêutica de Li, pois acima de ~ 1 mM é tóxico, provavelmente pelo efeito inibitório direto da GSK3 $\beta$ . Logo, a indução da fosforilação inibitória da GSK3 $\beta$  pelo lítio pode ser crítica para a sua eficácia terapêutica e tolerabilidade, reforçando que embora o Li apresente ativa resposta no TAB, há a necessidade de novos medicamentos com menos efeitos colaterais e potencialmente tóxicos (BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015), pois a preocupação com seus efeitos nocivos e qual manejo clínico escolher (Quadro 2), com a perspectiva de tratamento para o TAB e para a qualidade de vida dos pacientes é uma dos grandes motivos de pesquisa de novas estratégias terapêuticas para esse transtorno.

## Efeitos colaterais e seu manejo.

<i>Efeitos colaterais</i>	<i>Comentários</i>	<i>Manejo</i>
<b>Aumento de peso</b> (Torrent et al, 2008)	Pode ocorrer a médio prazo, mas tende a estabilizar.	Orientação dietética e atividade física regular.
<b>Distúrbios gastrointestinais</b> (Freeman e Freeman, 2006)	Desconforto gastrointestinal, diarreia, náuseas e vômitos. Pode se dever ao pico plasmático ou maior sensibilidade gástrica. Tendem a desaparecer com o tempo. Podem ser sinais de níveis tóxicos.	Alterar horários de tomada (dose concentrada ao deitar ou durante refeições). Tentar comprimidos de liberação controlada (CR). Orientar dieta obstipante.
<b>Sonolência</b> (Freeman e Freeman, 2006)	Em geral pouco intenso e melhora com o tempo. Pode ser sinal de nível tóxico.	Concentrar dose à noite.
<b>Alterações da função sexual</b> (Stimmel e Gutierrez, 2006)	Redução do desejo sexual e raramente anorgasmia.	Tentar reduzir medicações concomitantes com perfil semelhante de efeito colateral. Associação de trazodona ou bupropiona.
<b>Alterações da função tireoideana</b> (Freeman e Freeman, 2006)	Não está relacionado à indução de anticorpos, mas induz hipotireoidismo com uso prolongado (mais de 6 a 18 meses). Afeta em torno de 30% dos pacientes, sendo mais comum em mulheres. Pode estar associado à ciclagem rápida e leva a um maior risco de depressão.	Administrar levotiroxina em dose suficiente para normalização dos valores de TSH, mesmo se hipotireoidismo subclínico.
<b>Alterações da função renal</b> (Freeman e Freeman, 2006)	Há relatos de ocorrência de fibrose intestinal, esclerose glomerular, disfunção da reabsorção de água e aumento de creatinina com o uso prolongado de anos.	Monitorar função renal com frequência frente a suspeita de comprometimento renal. Manter doses mínimas necessárias. Substituir lítio se alterações se configurarem progressivas.
<b>Polidipsia, poliúria</b> (Freeman e Freeman, 2006)	Pode ocorrer uma redução da resposta renal ao hormônio antidiurético. Pode ocorrer Diabetes Insipidus Nefrogênica.	Controle da ingestão hídrica. Administração em dose única a noite pode melhorar polidipsia e poliúria. Em casos resistentes o uso de diuréticos tiazídicos com monitoração de eletrólitos ou diuréticos poupadores de potássio (amiloride). Redução de dose pode auxiliar no controle.
<b>Fadiga, lentificação motora, fraqueza muscular</b> (Ghadirian e Lehmann, 1980)	Podem ser sinais de níveis tóxicos. Podem melhorar com o tempo.	No caso de persistência pensar em redução de dose ou substituição.
<b>Tonturas</b> (Ghadirian e Lehmann, 1980)	Melhoram com o tempo.	Alterar horários, concentrar à noite. Uso de dimenidrato auxilia.
<b>Tremores</b> (Van Gerpen, 2002)	Os tremores em geral são de extremidades e finos. Pode ser sinal de nível tóxico.	Reduzir dose se possível. Uso de betabloqueadores pode controlar o tremor. Uso de bebidas com alto teor de cafeína pode contribuir para o tremor.
<b>Alterações cognitivas</b> (Pachet e Wisniewski, 2003)	Prejuízos de memória podem ocorrer.	Manter em dose mínima necessária ou avaliar substituição.
<b>Problemas dermatológicos</b> (Yeung e Chan, 2004)	Precipitação ou exacerbação de acne e psoríase.	Tratamento dermatológico específico controla o quadro em geral.
<b>Alterações cardiovasculares</b> (Freeman e Freeman, 2006)	Ocorrem com níveis plasmáticos muito elevados, com bloqueios de condução, alargamento de intervalo QT, inversão e achatamento de onde T.	Monitorar indivíduos cardiopatas com ECG frequente. Manter controle rigoroso dos níveis terapêuticos.

Quadro 2: Efeitos colaterais do Lítio e seu manejo (ZUNG; MICHELON; CORDEIRO, 2010)



### 1.3.2 Valproato de Sódio

O ácido valproico (VAL), um inibidor da histona desacetilase, é comumente prescrito para pacientes com epilepsia e TAB por seus efeitos anticonvulsivos e estabilizadores do humor. Exerce efeitos antiepilépticos através da modulação de várias vias, tais como a inibição das desacetilases de histonas (HDACs) e da glicogênio sintase quinase, GSK3 $\beta$ , supressão da transaminação de ácido butírico de aminoácidos gama e excitabilidade neuronal mediada por N-Metil D-Aspartato, bloqueando os canais de cálcio e de sódio. A eficácia, a tolerabilidade e a segurança do VAL foram comprovadas para vários tipos de convulsões. No TAB, avanços na pesquisa pré-clínica indicam que seu papel neuroprotetor, possuindo propriedades anti-inflamatórias, antiapoptóticas e neurotróficas (CHEN et al., 2014), características que reforçam sua prescrição para o TAB em consonância com sua ação nas vias de fisiopatologia deste transtorno. Clinicamente isso é observado através de suas propriedades antimaníacas equivalentes ao Li, com indícios do seu papel nas recaídas dos pacientes quando no estado maníaco.

Levando em consideração sua atividade terapêutica como inibidor das histonas, que atuam como invólucro e organização do DNA, e seu envolvimento na fisiopatologia do TAB, vale ressaltar que essas proteínas têm locais onde se ligam grupos acetil, e quando estas são acetiladas por enzimas acetiltransferase, elas facilitam a ligação de fatores de transcrição ao DNA. Em contraste, as enzimas histonas desacetilase (HDAC) são responsáveis pela remoção dos grupos de acetil das histonas, condensando o DNA e inibindo a transcrição do gene. Estudos demonstraram que a modulação da atividade de HDAC pode ser um alvo terapêutico de fármacos para o TAB como o Li e o Val, onde o valproato foi capaz de reverter distúrbios associados ao estresse oxidativo, as neurotrofinas e alterações comportamentais em modelos animais de depressão (LOPES-BORGES et al., 2014).

Ademais, embora sua prescrição para o TAB esteja instituída como uma alternativa ao Li e aos antipsicóticos dependendo do estágio do paciente, algumas limitações são associadas ao tratamento com VAL, desde falta de efetividade na totalidade dos pacientes, apesar com resposta melhor em pacientes com ciclagem rápida ou episódios mistos, demonstra ser menos ativo que os antipsicóticos usados na mania aguda. Também exibe uma predisposição a efeitos colaterais, interações farmacológicas com outros fármacos também prescritos para o transtorno, além do potencial teratogênico

e da necessidade de monitorização terapêutica (FREEMAN; STOLL, 1998). Dessa forma, apesar do uso estabelecido do VAL para o transtorno, suas limitações indicam e avigoram que assim como o Li e as outras alternativas de tratamento, há necessidade de pesquisa e investigação de novos fármacos, com menos efeitos colaterais e mais efetividade, reforçando o trajeto e a hipótese inicial deste trabalho.

#### **1.4 Redirecionamento de fármacos para o tratamento do TAB**

A etiologia do TAB ainda não é totalmente conhecida e, relacionado a isto, nenhum agente terapêutico foi desenvolvido especificamente com base na compreensão da fisiopatologia do transtorno, gerando a necessidade de medicamentos com mecanismo de ação diversos para tratamentos efetivos. Nesse contexto, medicamentos como lítio, valproato, carbamazepina e antipsicóticos atípicos são utilizados para o tratamento da mania. Embora essas drogas tenham atividade terapêutica para muitos indivíduos com TAB, problemas significativos ainda permanecem, como tolerabilidade e eficácia. A adesão ao tratamento também é afetada por efeitos adversos, tais como sedação e ganho de peso. Portanto, existe uma necessidade urgente de desenvolver novos tratamentos mais diligentes para o TAB (AHMAD et al., 2016).

Para tanto, estudos pré-clínicos vêm buscando contribuir com a investigação de novas substâncias através dos testes em modelos animais. Temos como exemplo a investigação por nosso grupo de pesquisa da atividade do ácido lipóico no modelo animal de mania induzido por d-anfetamina, com promissores resultados (MACÊDO et al., 2012).

A busca por novas substâncias terapêuticas pode seguir dois caminhos: i) descoberta de substâncias novas sem nenhum uso terapêutico ainda na clínica, ii) substâncias já prescritas para outra finalidade, mas devido a atuar em vias da fisiopatologia do transtorno estudado, serem úteis de forma a que pesquisas possam sugerir o redirecionamento ou ampliação de sua indicação, contribuindo para que substâncias que já estão no mercado possam com comprovação científica ampliar sua indicação na clínica.

Um medicamento que é aprovado para uma certa indicação não limita que esta seja a única admissível, e que o medicamento só possa ser prescrito para ela. Outras indicações podem estar sendo, ou vir a ser pesquisadas, as quais, submetidas ao órgão

responsável, e quando terminados os estudos, poderão vir ser aprovadas. Estudos concluídos ou realizados após a aprovação inicial podem, por exemplo, expandir o uso do medicamento para outra faixa etária, para uma fase distinta da mesma doença para a qual a recomendação foi aprovada, ou para uma outra patologia, assim como o uso pode se tornar mais limitado do que inicialmente se aprovou. Uma vez comercializado o medicamento, enquanto as novas indicações não são aprovadas, seja porque as evidências para tal ainda não estão concluídas, ou porque a agência reguladora ainda as está avaliando, é possível que um médico já veja a necessidade de prescrever o medicamento para um seu paciente que tenha uma delas. É possível ocorrer situações de um médico querer tratar pacientes que apresentem uma certa condição que, por afinidade com outra análoga, ou por base fisiopatológica, ele creia que a prescrição de um determinado medicamento ainda não aprovado para determinada indicação possa vir a favorecer o tratamento. O medicamento sendo empregado nas circunstâncias propostas acima está caracterizado o uso off label do medicamento, ou seja, o uso ainda não aprovado para aquela indicação. O uso off label de um medicamento é feito por responsabilidade do médico que o prescreve, e pode vir a assinalar-se como um erro médico, mas em grande parte das vezes trata-se de uso essencialmente correto, apenas ainda não aprovado (ANVISA,2017).

Com o aumento das pesquisas e descoberta dos processos fisiopatológicas de transtornos mentais e vias de atuação de fármacos, o uso off-label é algo que vem aumentando. Entretanto, como já citado, a comprovação científica é o que pode reforçar e indicar de forma documentada uma nova indicação a um medicamento já estabelecido no mercado. Esse ponto é de grande contribuição para a população, pois assim, os medicamentos já terão disponibilidade para compra e tratamento, bem como o custo ser mais acessível, e isso contribuir de forma extremamente significativa para o tratamento de transtornos mentais como no caso da mania.

Portanto, o presente trabalho buscou contribuir investigando, a partir de indicações na literatura de uma substância já estabelecida no mercado com indicação como antibiótico, a minociclina, e seu potencial em transtornos mentais devido a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, e regulatória em processos de neurotoxicidade relacionadas a neurotransmissores como serotonina e glutamato.(KIM; SUH, 2009) (FUJITA et al., 2012). Tendo como finalidade principal investigar sua atividade no

modelo animal de mania, visto que nesse transtorno, ainda não há literatura indicando seu potencial terapêutico.

### **1.5 Minociclina nos transtornos psiquiátricos**

A minociclina é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração que tem uso terapêutico há mais de 30 anos devido a suas propriedades antibióticas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. É uma molécula com características lipofílica, o que lhe confere a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica de seres humanos melhor do que outras tetraciclina. É facilmente absorvida pelo intestino após ingestão oral, o que implica em apresentar baixa tendência a produzir resistência bacteriana (MIYAOKA et al., 2007).

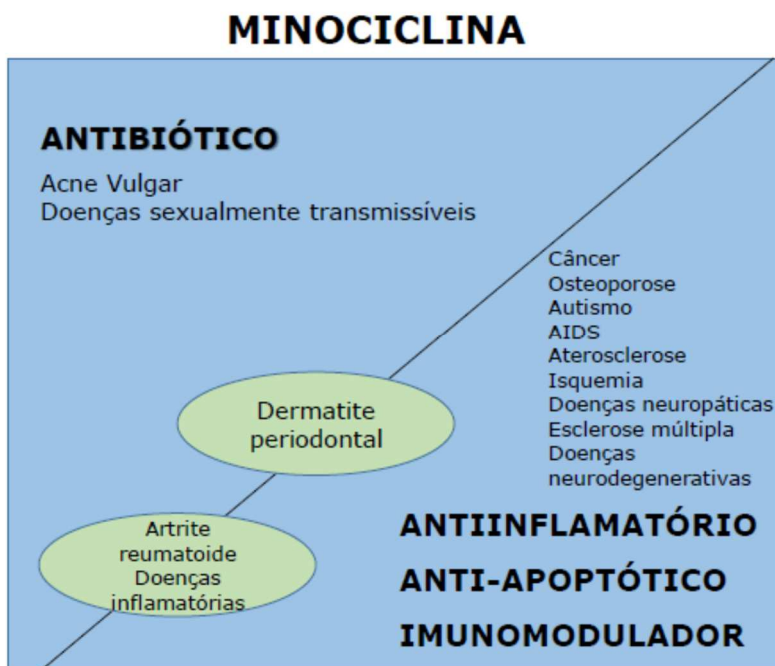
Apresenta excelente biodisponibilidade por via oral, com meia vida de 11-22 horas, o que a permite atingir concentração plasmática 12 vezes superior aos outros compostos do grupo. Outra propriedade deste fármaco é sua organização molecular que lhe garante ter até cinco vezes mais afinidade por lipídios que as demais tetraciclina em pH fisiológico, o que proporciona alta difusão através das membranas fosfolipídicas, e permite obter concentrações clinicamente relevantes no Sistema Nervoso Central (SNC) (OLIVEIRA et al., 2014).

É usada principalmente no tratamento da acne vulgar e algumas doenças sexualmente transmissíveis. Recentemente, tem sido relatado que as tetraciclina podem exercer uma variedade de ações biológicas que são independentes da sua atividade antimicrobiana, incluindo atividade antiinflamatória e anti-apoptótica, inibição da proteólise, angiogênese e metástase tumoral. Essas descobertas dizem especificamente respeito à minociclina. Descobriu-se também que possui diversos efeitos biológicos não-antibióticos que são benéficos em modelos experimentais de várias doenças com base inflamatória, incluindo dermatite, periodontite, aterosclerose e distúrbios auto-imunes como artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal. Além disso, a minociclina também surgiu como a substância mais eficaz derivada de tetraciclina com papel neuroprotetor (GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013) (DEAN et al., 2012a).

Dessa forma, vários estudos têm destacado o papel potencial da minociclina, segunda geração de tetraciclina (Figura 6), com sua característica de atravessar a barreira

hematoencefálica (ESALATMANESH et al., 2016) como agente neuroprotetor contra múltiplas condições neurodegenerativas e neuroinflamatórias, como Parkinson (QUINTERO et al., 2006), Huntington (KUMAR; CHAUDHARY; MISHRA, 2013), doença de Alzheimer ((EL-SHIMY; HEIKAL; HAMDI, 2015), esquizofrenia, depressão e autismo (ESALATMANESH et al., 2016) (RÉUS et al., 2015). As propriedades neuroprotetoras da minociclina são atribuídas, em parte, devido aos efeitos na inibição das células da glia (astrócito / microglia), caspase 1 e iNOS (MIYAOKA et al., 2007), além de poder também estar implicada a sua associação à preservação de integridade mitocondrial e citocromo c (CHEN et al., 2012).

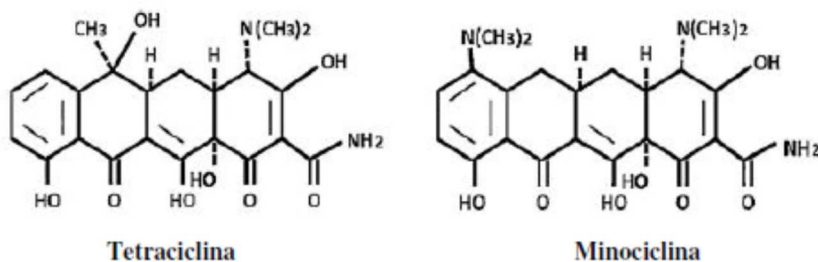
Seus efeitos benéficos nos transtornos mentais foram atribuídos ao seu importante papel anti-inflamatório com atividade regulatória sobre agentes pró-inflamatórios, incluindo o óxido nítrico, o fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$ , suas propriedades neurotróficas, antioxidantes e propriedades anti-apoptóticas (KRAUS et al., 2005) (GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013) (KIM; SUH, 2009). Nos últimos anos, os benefícios da minociclina para o tratamento de transtornos psiquiátricos vem sendo explorado (DEAN et al., 2012a). Estudos em animais mostraram que a minociclina diminui o efeito neurotóxico induzido pelo glutamato, como também da serotonina e da dopamina no córtex pré-frontal, além de sua capacidade de promover a neurogênese. Quanto as desordens do humor, alguns estudos evidenciaram o potencial da minociclina como tratamento adjuvante para depressão bipolar (HUSAIN et al., 2017) (SAVITZ et al., 2012) e depressão unipolar (MIYAOKA et al., 2012).



**Figura 5** – Efeito clínico da Minociclina com atividade antibiótica e não antimicrobiana (Adaptado de (GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013))

No entanto, há uma falta de estudos sobre os possíveis efeitos da minociclina na mania, bem como explorar os possíveis mecanismos relacionados a esta ação.

Acredita-se que esse seu potencial de diminuir o efeito neurotóxico induzido pelos neurotransmissores glutamato e dopamina, sua atividade na neurogênese, como antioxidante e antiinflamatório corroborem para possível atuação nas vias fisiopatológicas do TAB, sendo assim uma substância a ser mais investigada tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos da mania do TAB (DEAN et al., 2012a) (DEAN et al., 2017).



**Figura 6.** Estrutura química da tetraciclina e da minociclina (GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013)

## 1.6 Relevância e Justificativa

Os transtornos psiquiátricos se caracterizam por alterações nos âmbitos mentais que envolvem primariamente atividade desregulada de neurotransmissores e conseqüentemente na ação em áreas cerebrais que intervêm no comportamento de indivíduos que são acometidos e em suas atividades sociais e psicológicas com prejuízos familiares, laborais e financeiros, sendo dessa forma um campo de necessário interesse de pesquisadores da área de saúde mental ao redor de todo o mundo.

Dentre esses transtornos, o TAB vem sendo objeto de investigação de vários grupos de pesquisa, haja vista a prevalência de em torno de 2% da população mundial, acometendo homens e mulheres no mesmo percentual e com alterações de humor, memória, cognitiva, de trabalho e havendo uma grande relação entre o transtorno e o acometimento de suicídio, sendo assim um grande problema de saúde pública.

Embora os estudos acerca do TAB sejam intensos, seu tratamento farmacológico ainda permanece com significativas limitações, tendo um arsenal terapêutico curto e com baixa efetividade clínica, além dos efeitos colaterais que influenciam na adesão ao tratamento dos pacientes. O principal fármaco para tratamento do TAB é o carbonato de Lítio, que atua há décadas como principal escolha, embora apresente potencial efeito tóxico.

Na busca de novos tratamentos farmacológicos evidencia-se a necessidade de modelos animais robustos e confiáveis em termos de semelhança comportamental, fisiopatológica e a resposta aos tratamentos conhecidos. Novos modelos animais para o TAB são necessários, visando compreender melhor sua fisiopatologia e também contribuir como meio de novos tratamentos. Vale destacar que os modelos animais mais utilizados mimetizam apenas fases distintas do transtorno, como mania ou depressão. No caso específico da simulação de comportamentos tipo mania o comportamento mais avaliado é a hiperlocomoção, que simularia a agitação psicomotora dos pacientes. Vale destacar que uma investigação comportamental mais ampla se faz necessária para o melhor dimensionamento dos efeitos dos fármacos estudados através destes modelos.

Neste contexto, o presente estudo se propôs a investigar o efeito do GBR 12909 uma substância com ação inibidora do DAT, através da análise inicial de curva dose x resposta com administração aguda do GBR 12909 e posterior adequação a protocolos já estabelecidos como o protocolo de mania induzido por anfetamina, com 14 (quatorze) dias de tratamento nos protocolos de prevenção e reversão. Feito isso, buscando novas

alternativas de fármacos, foi administrado nos animais em que foi induzido o modelo tipo mania do TAB com GBR 12909, a minociclina, uma tetracilina que vem se mostrando nos últimos anos com potencial neuroprotetor e efeitos clínicos em transtornos psiquiátricos como depressão e esquizofrenia, e a comparação do seu efeito aos de grupos tratados com Li e Val.

Logo, pesquisas que investiguem tanto novos modelos animais em psiquiatria, bem como novos fármacos, ou mesmo o redirecionamento destes, como no caso da minociclina, se mostram de grande relevância, já que com resultados significativos podem agir de forma translacional atuando como uma ponte e contribuição dos estudos pré-clínicos na atividade e prática clínica de pacientes e profissionais da área de saúde mental.



## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

✓ Estudar alterações comportamentais e neuroquímicas no modelo animal de mania induzido pela administração aguda ou repetida do inibidor do DAT, GBR 12909, determinando também os efeitos preventivos e terapêuticos de drogas estabilizadoras do humor e da minociclina, como estratégia de redirecionamento de fármaco no tratamento da mania.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### Capítulo I:

- Determinar o curso temporal (no período de 24h) das alterações comportamentais, oxidativas e neurotróficas induzidas pela administração aguda do inibidor do DAT, GBR12909;
- Determinar o efeito preventivo dos estabilizadores do humor, lítio (Li) e Valproato (VAL) no modelo de mania por GBR12909;

#### Capítulo II:

- Avaliar os efeitos da minociclina nas doses de 25 e 50mg/kg na prevenção e reversão das alterações comportamentais (hiperlocomção e comportamento de risco) e neuroquímicos [glutaciona (GSH), substância reativa a ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de BDNF] em camundongos submetidos à administração repetida do inibidor do transporte de dopamina, GBR12909;

#### Capítulo III:

- Investigar os efeitos da minociclina nas doses de 25 e 50mg/kg na reversão e prevenção das alterações comportamentais (memória de trabalho, ansiedade, comportamento de risco e interação social);
- Avaliar as alterações hipocampais na expressão de DAT e IBA1 (marcador de ativação microglial) em animais submetidos ao modelo de mania por administração repetida de GBR12909 e tratados com minociclina;

### **3.0 METODOLOGIA**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados Camundongos Swiss machos adultos (25-30g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos a um ciclo claro/escuro inverso de 12 h e ambientados em grupos de 8 animais com livre acesso a comida e água. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética e uso de animais (CEUA) da UFC sob número 137/14 e os experimentos foram conduzidos de acordo com diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### **3.2 Drogas**

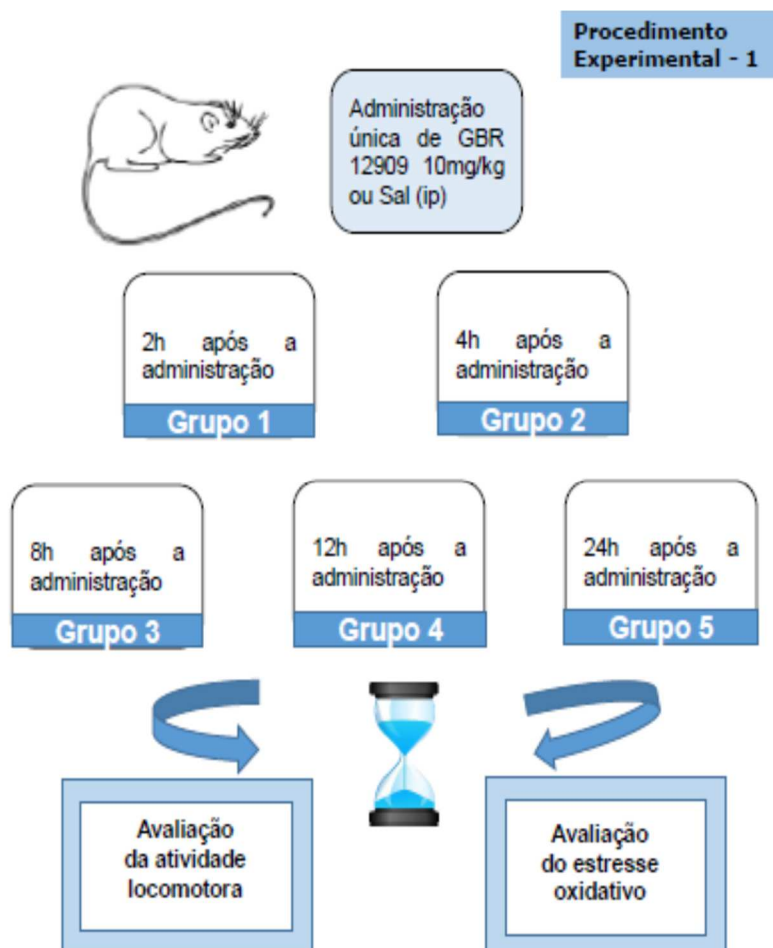
Os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p) de cloridrato de minociclina (Sigma Aldrich, St Louis, USA, Mino 25 ou 50mg/kg) dissolvida em 2% de dimetilsulfoxido (DMSO). GBR 12909 dihidrocloridrato (Sigma, St. Louis, USA) 10mg/kg, Carbonato de Lítio 47,5 mg/kg (Li; Sigma, St Louis, USA) foi dissolvido em água destilada e Valproato de Sódio 200mg/kg (VAL, Life Pharmaceutical Company) dissolvido em Solução Salina 0,9%. Grupos controle receberam Solução Salina 0,9%. Todas as soluções foram administradas em um volume de 0,1 ml a cada 10g de peso corporal.

#### **3.3 Desenho Experimental**

Os experimentos foram divididos em três tipos de protocolos: Protocolo I: curva dose x tempo das alterações comportamentais e de estresse oxidativo induzidas por GBR 12909 (Figura 7) e determinação da atividade preventiva do lítio e valproato em parâmetros comportamentais e oxidativos induzidos pela administração aguda de GBR 12909 (Figura 8).

**PROTOCOLO I (a) - GBR 12909 como um modelo animal de mania: curso temporal de alterações comportamentais e oxidativas em áreas cerebrais e efeito de fármacos estabilizadores do humor**

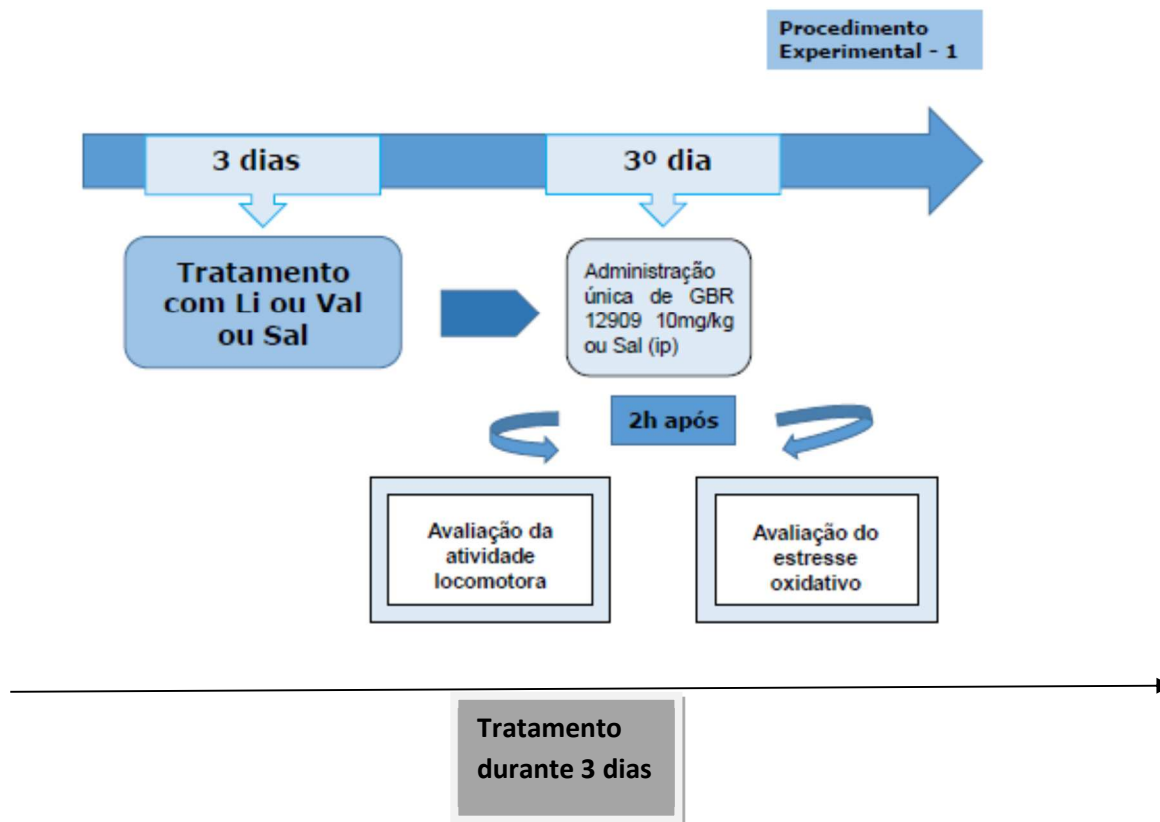
**Figura 7 – Protocolo experimental 1**



Camundongos Swiss foram submetidos a uma administração de GBR12909 e submetidos a avaliação locomotora e de parâmetros de estresse oxidativo (GSH e TBARS), 2, 4, 8, 12 ou 24 h pós-GBR12909.

**Fonte:** Própria autora

**Figura 8 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL I (b): Prevenção por estabilizadores do humor**



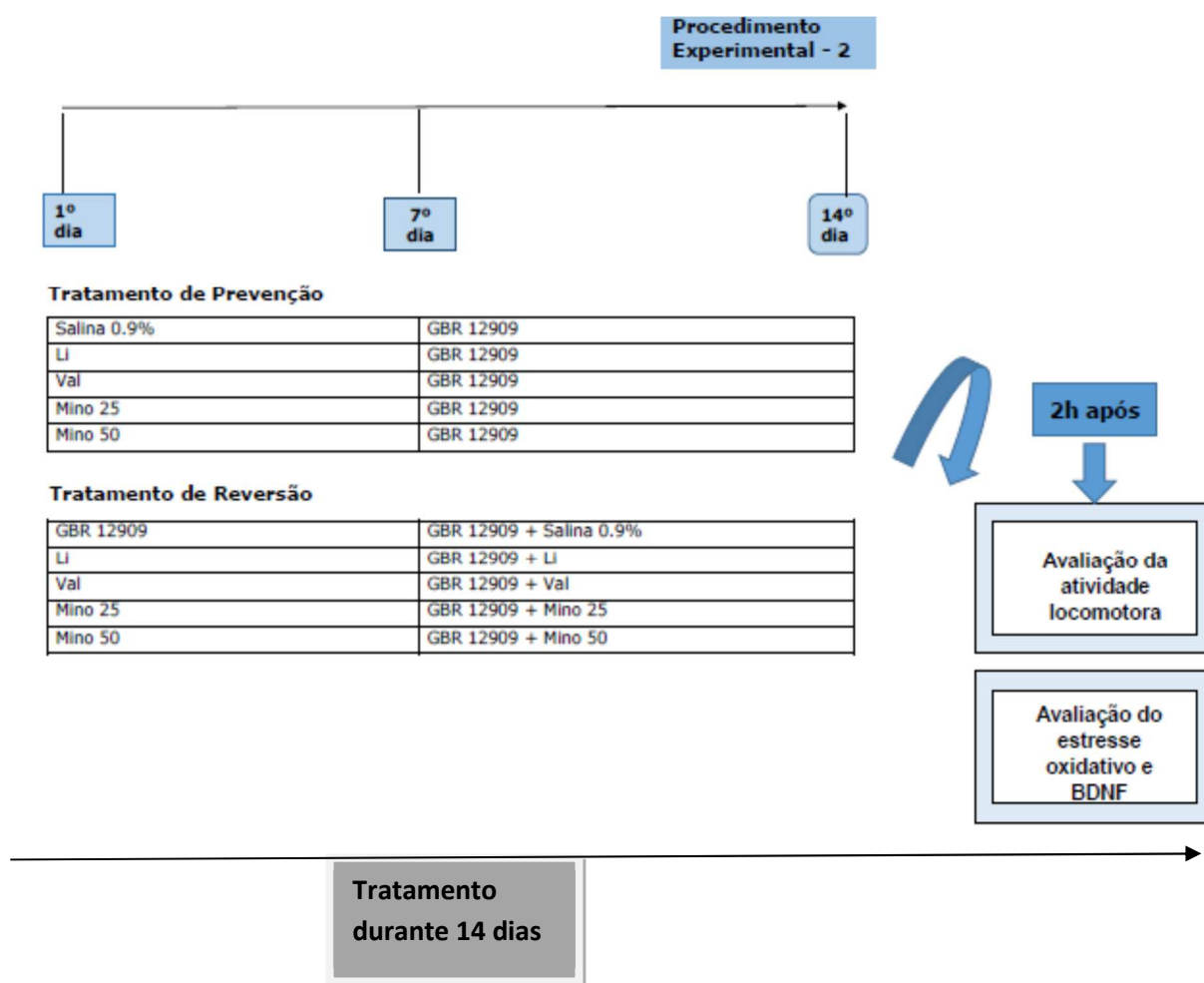
Camundongos Swiss foram tratados por 3 dias com medicações estabilizadoras do humor, lítio ou valproato ou salina. No terceiro dia receberam uma administração de GBR12909 ou salina e foram avaliados 2 h após para a determinação de alterações locomotoras e oxidativas. O tempo de 2 h foi escolhido baseando-se que nesse período o fármaco já iniciou sua atividade farmacológica após administração.

**Fonte:** Figura elaborada pela autora

Protocolo II: Determinação da prevenção e reversão (tratamento de 14 dias) nos parâmetros comportamentais, oxidantes e neurotróficos de animais submetidos ao modelo de mania induzido por GBR 12909 pela minociclina;

### PROCOLO II - Efeito da minociclina no modelo de mania induzido por GBR12909 em camundongos: papel de mecanismos antioxidantes e neurotróficos

Figura 9 – Protocolo experimental II



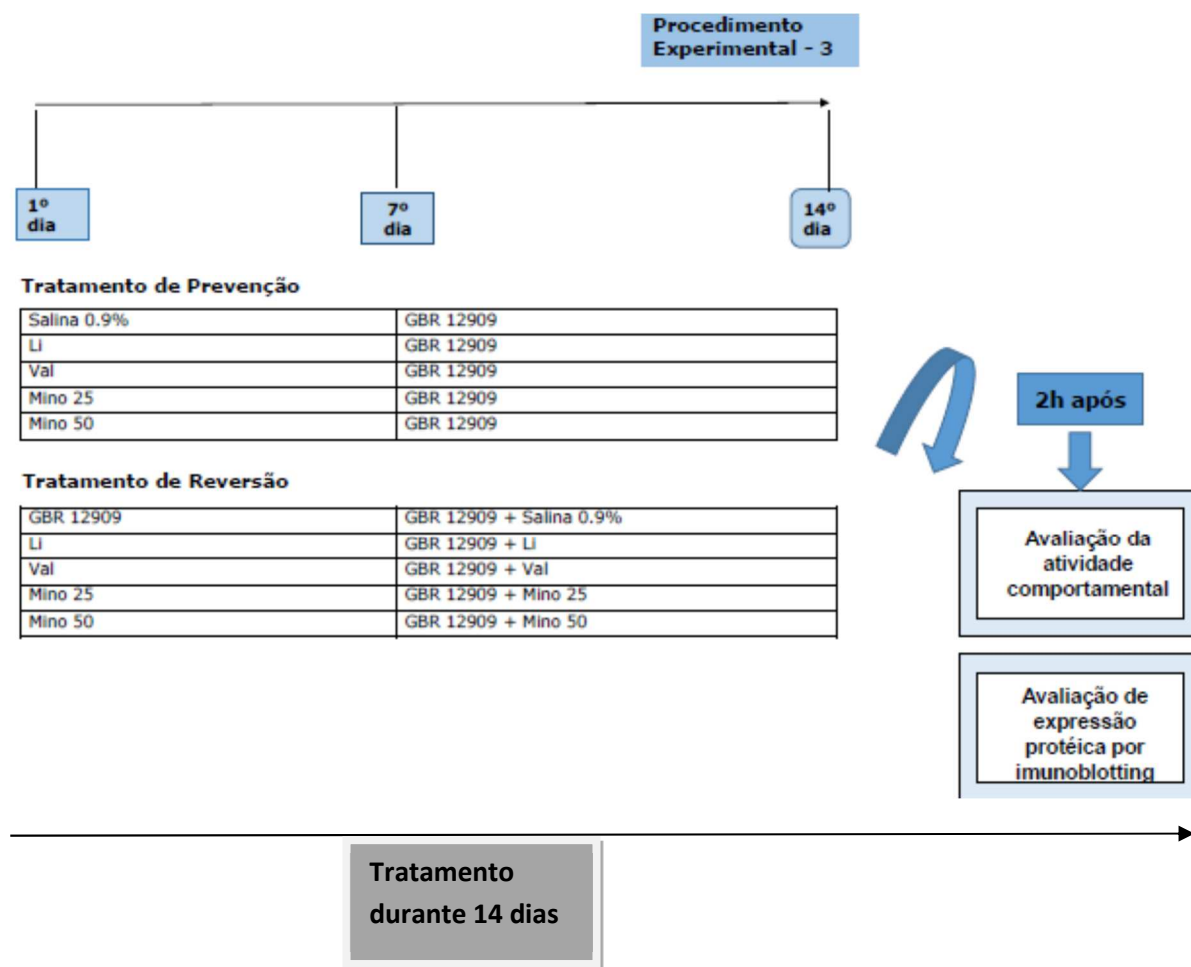
Fonte: Figura elaborada pela autora

Diferentes grupos de camundongos Swiss foram submetidos a protocolos e prevenção ou reversão, ambos durando 14 dias. No protocolo de prevenção os animais receberam Salina, Lítio ou Minociclina (Mino) nas doses de 25 ou 50 mg/kg por 7 dias e foram tratados por mais 7 dias com as estratégias de prevenção e 30 min após com GBR12909. No protocolo de reversão os animais receberam GBR12909 por 7 dias e por mais sete dias receberam além do GBR12909 Salina, Lítio ou Minociclina (Mino) nas doses de 25 ou 50 mg/kg. 2 h após a última administração das drogas os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e teste do odor do gato e tiveram seus cérebros dissecados para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e BDNF.

Legenda: GBR = GBR12909 10 mg/kg intraperitoneal (i.p.); Sal = salina 0,9% i.p.; Li = lítio 47,5 mg/kg i.p.; MINO25 = Minociclina 25 mg/kg via oral (i.p.); MINO50 = minociclina 50 mg/kg v.o.

Protocolo III: Determinação da prevenção e reversão de parâmetros comportamentais e de alterações na expressão de proteínas hipocampais pela minociclina (Figura 10).

**Figura 10 - Protocolo experimental III: avaliação de memória e de comportamentos relacionados a ansiedade em animais submetidos ao modelo de mania induzido pela administração repetida de GBR12909 e tratados com estabilizadores do humor e minociclina**



**Fonte:** Figura elaborada pela autora

Diferentes grupos de camundongos Swiss foram submetidos a protocolos de prevenção ou reversão, ambos durando 14 dias. No protocolo de prevenção os animais receberam salina, lítio ou Minociclina (Mino) nas doses de 25 ou 50 mg/kg por 7 dias e foram tratados por mais 7 dias com as estratégias de prevenção e 30 min após com GBR12909. No protocolo de reversão os animais receberam GBR12909 por 7 dias e por mais sete dias receberam além do GBR12909 salina, lítio ou Minociclina (Mino) nas doses de 25 ou 50 mg/kg. 2 h após a última administração das drogas os animais foram submetidos aos testes de labirinto em Y (avaliação da memória de trabalho), interação social e labirinto em cruz (avaliação da ansiedade) e tiveram seus cérebros dissecados para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e BDNF.

Legenda: GBR = GBR12909 10 mg/kg intraperitoneal (i.p.); Sal = salina 0,9% i.p.; Li = lítio 47,5 mg/kg i.p.; MINO25 = Minociclina 25 mg/kg via oral (i.p.); MINO50 = minociclina 50 mg/kg v.o.

No primeiro protocolo, grupos foram avaliados nos tempos 2, 4, 8, 12 ou 24 h após administração de GBR 12909, bem como foram tratados de forma preventiva com Li, Val ou Sal por 3 (três) dias e no último dia (3º dia) 30 min e 2h pós-GBR 12909 foram avaliados quanto a alterações na atividade locomotora e testes de avaliação do estresse oxidativo. No segundo e terceiro protocolos foram aplicados os delineamentos experimentais de prevenção e reversão com a Minociclina nas doses de 25 e 50mg/kg, bem como com os estabilizadores de humor, Li e Val, em animais tratados com GBR12909. Na etapa de prevenção, buscou-se reproduzir a fase de manutenção do tratamento do TAB e na etapa de reversão o tratamento do episódio maníaco conforme descrito por (FREY et al., 2006c; YOUNG et al., 2010b). Tanto a etapa de prevenção como de reversão duraram ao todo 14 dias. No protocolo de prevenção os animais eram tratados nos 7 primeiros dias com Sal, Mino 25 ou 50 mg/kg, i.p. ou com os estabilizadores Li 47,5 mg/kg ou Val 200 mg/kg, e nos outros 7 dias a cada um desses grupos foi adicionado o GBR 12909 10mg/kg (ip). Na reversão os animais foram tratados nos 7 primeiros dias com GBR 12909 10mg/kg (ip) e nos outros 7 dias a cada grupo respectivo foi adicionado Sal ou Mino 25 ou 50 mg/kg, i.p. ou com os estabilizadores Li 47,5 mg/kg ou Val 200 mg/kg (Figura 9). Cada grupo foi constituído por oito a dez animais.

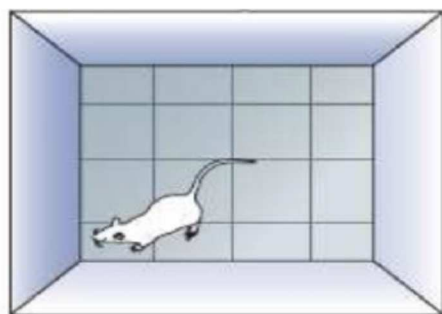
### 3.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais no período diurno entre 10 e 16 horas. Os animais foram transportados para a sala de comportamento nas suas caixas-moradia e foram manipulados pela base da cauda em todos os momentos. Essa forma de contenção foi escolhida com a finalidade de prevenir que ocorram fraturas, divulsão da pele e conseqüentes ferimentos, além disso, tal manobra dificulta que, devido a sua agilidade, o animal se vire e morda o operador (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005). Eles permaneceram nessa sala por pelo menos 24 horas antes do início dos testes para ambientação. Durante os testes de comportamento, o ambiente foi mantido com baixa luminosidade.

#### 3.4.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto foi realizado com a finalidade de avaliar a atividade locomotora (ARCHER, 1973) dos animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio, Valproato de Sódio e Minociclina. Foi realizado em um campo de 30 cm × 30 cm rodeado por paredes de 15 cm de altura feitas de acrílico. O chão preto do campo aberto foi dividido em nove partes iguais por linhas brancas. O aparelho foi colocado em uma sala com luz vermelha. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro do campo e foi permitido que eles explorassem livremente o cenário por 1 min (período de habituação). O parâmetro observado foi o número de quadrados cruzados (com as quatro patas) de maneira horizontal (crossing) e vertical (rearing) dos animais por um período de 5 minutos.

**Figura 11** – Desenho representativo para o aparato do teste do campo aberto.



Disponível

em:

<https://www.slideshare.net/AdvaitaMv/screening-of-anxiolytics-44529278>



### 3.4.2 Teste de interação social

O teste de interação social visou avaliar a interação social e a atividade motora dos animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio, Valproato de Sódio e Minociclina. O aparato do teste consiste em uma caixa de acrílico 60 x 40 cm dividida em três câmaras. Os animais foram capazes de mover-se entre as câmaras através de uma pequena abertura (6 x 6cm) em divisores. Nas câmaras das extremidades havia uma gaiola de ferro, uma com um camundongo desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta). Os animais teste foram colocados na câmara central, cada um teve um tempo de 5min de exploração na caixa (RADYUSHKIN; HAMMERSCHMIDT, 2009) . Foi medido o tempo gasto em cada uma das três câmaras, e a preferência social foi definida como: (% tempo gasto na câmara social ) – (% tempo gasto na câmara oposta).

**Figura 12** - Representação do aparato utilizado no teste de interação social



Disponível em: <http://www.cebiolog.com.br/comportamento--labirinto--rastreamento.html>

### 3.4.3 Teste do labirinto em Y (Y-maze)

O teste do labirinto em Y visou avaliar a memória de trabalho e o comportamento cognitivo exploratório dos animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio, Valproato de Sódio e Minociclina. O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura cada convergindo a um ângulo igual. Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado (exemplo de alternância correta: braços 1,2,3 ou 3,1,2). Assim, a percentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre as alternâncias corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100 (FRASER et al., 1996), (DALL'IGNA et al., 2004).

**Figura 13** - Desenho representativo do aparato para o teste Labirinto em Y

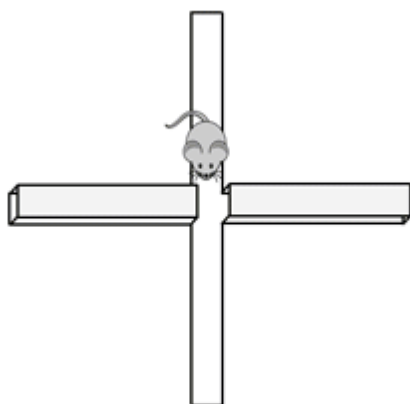


(STONE et al., 1991)

### 3.4.4 Labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*)

O labirinto em cruz elevado, originalmente descrito por (PELLOW et al., 1985), visou avaliar o comportamento de risco e ansiedade dos animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio, Valproato de Sódio e Minociclina. O aparato é composto de acrílico e coberto por fórmica preta, e consiste em dois braços abertos opostos (50x10 cm), e dois braços opostos fechados (50x10 cm). Os quatro braços estão elevados 50 cm do chão. O animal é colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados no início do experimento. Foi registrado o tempo de permanência do animal em cada braço (TEBA e TEBF) e o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e fechados (NEBF), durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em porcentagem, levando em consideração a atividade de entrada e tempo do animal nos braços abertos, já que a exposição nesse braço está relacionada com o comportamento de risco que visamos observar. O cálculo da porcentagem de TEBA se deu através da multiplicação do tempo em segundos (s) que o animal permaneceu nos braços abertos multiplicado por 100 e dividido por 5 minutos, o que equivale a 300s em segundos. Já o cálculo da porcentagem do NEBA se deu através da número de entradas nos braços abertos multiplicado por 100 e dividido pela soma de movimento do animal entre os braços abertos e os braços fechados. O experimento foi realizado numa sala de comportamento isolada de ruídos e com baixa iluminação.

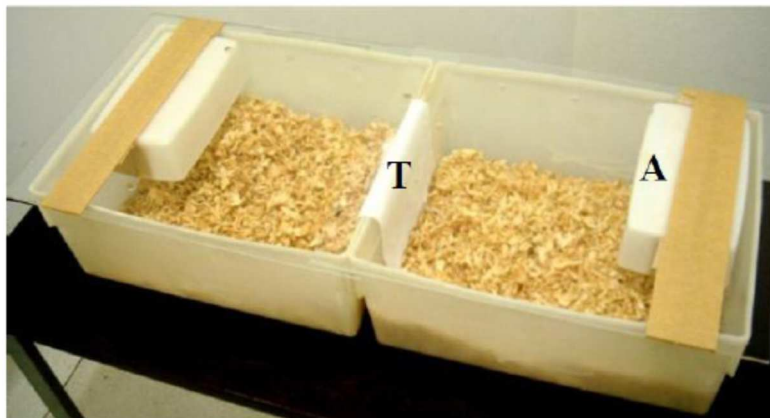
**Figura 14** - Desenho representativo do aparato para o teste plus maze



### 3.4.5 Teste do odor do gato

O teste do odor do gato visou avaliar o comportamento de risco dos animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio, Valproato de Sódio e Minociclina. Este teste ocorreu sob iluminação de luz vermelha em uma arena de teste transparente medindo 40 cm de comprimento x 27 cm de largura x 36 cm de altura. Os camundongos foram expostos a duas condições de odor: de gato ou neutra. No dia do teste (14º dia), o odor de gato foi obtido esfregando vigorosamente um pano úmido (18 × 22 cm) contra a pele de um gato adulto feminino doméstico por 5 min. Para o teste com o odor neutro, também foi utilizado um pedaço de tecido umedecido, só que sem contato com gatos. Este procedimento foi realizado 1 h antes da sessão experimental. Antes da primeira exposição ao odor de gato, o pano impregnado foi deixado por dez minutos na sala teste e os animais foram expostos em suas gaiolas-moradia à tampa de acrílico um dia anterior ao teste, por um período de dez minutos, com o intuito de habituá-los ao aparato. O pano de odor para gato foi mantido em uma bolsa de plástico selada. Cada pano foi usado apenas para uma exposição. As peças úmidas do pano original, não esfregadas no gato, foram usadas para o odor neutro. Todas as exposições de odor neutro sempre precederam as exposições ao odor do gato, a fim de evitar vestígios de odor de gato que influenciem o grupo de odor neutro. A arena de teste e a barreira de esconderijo foram lavadas com sabão laboratorial sem perfume e água após cada animal. Para cada animal, o teste foi realizado durante 5 min. Os parâmetros gravados foram: o número de contatos do pano do gato, o tempo dos contatos do pano do gato e a duração dos eventos na área de proteção. O contato do tecido foi definido como contato direto ou sentindo o odor  $\leq 5$  cm do pano. O evento de abrigo foi definido quando a entrada de animais com as quatro pernas na área de proteção atrás da barreira de esconderijo (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001a) (KIRSTEN et al., 2011).

**Figura 15** - Aparato utilizado para o teste do estímulo olfativo aversivo, onde dois animais foram avaliados individualmente e simultaneamente em gaiolas-moradia separadas, contando com (T) um tecido impregnado com ou sem o odor de gato e (A) um abrigo no lado oposto (Figura adaptada de (KIRSTEN et al., 2011)).



### 3.5 Medição dos níveis séricos de lítio

Seguindo a decapitação, o soro de cada animal tratado com lítio foi separado por centrifugação. Os ensaios foram realizados com um fotômetro de chama digital (AP LabNova série 1500, São Paulo, Brasil). Animais apresentaram níveis de lítio no intervalo de 0,8-1,1 mEq / l, tal como recomendado para o tratamento de pacientes com TAB (HOPKINS; GELENBERG, 2000).

### 3.6 Determinação de parâmetros de dano oxidativo

Os testes para avaliação do estresse oxidativo foram o da determinação de Glutationa Reduzida (GSH) e dos Níveis de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), visando aferir os níveis de Glutationa Reduzida e do Malonaldeído (MDA) nas áreas cerebrais corpo estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e vermis cerebelar de animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio, Valproato de Sódio e Minociclina.

#### 3.6.1 Preparação de tecido

As amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas (10 vezes (w/v) arrefecidas com gelo, com 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos, e alíquotas dos sobrenadantes foram separados e usados para a determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

### **3.6.2 Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)**

Os níveis de GSH foram quantificados com o objetivo de avaliar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas do cérebro foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% w / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado será recolhido e os níveis de GSH determinados (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Resumidamente, as amostras serão misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculada com base numa curva padrão de glutathiona e expressos como ng de GSH/g de tecido úmido.

### **3.6.3 Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos. As amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e foi expressa como µmol tecido malonaldeído (MDA) / mg de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

### **3.7 Dosagem de BDNF hipocampal**

A dosagem de BDNF buscou quantificar na área cerebral hipocampo a neuroplasticidade de animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio, Valproato de Sódio e Minociclina. Os níveis de BDNF foram quantificados no hipocampo por ELISA, através de ensaio imunoenzimático (Kit DuoSet R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para BDNF por 18h em temperatura ambiente com 100µL de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL

de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200µL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100µL das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200µl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para BDNF em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/g de tecido.

### **3.8 Determinação dos marcadores DAT e IBA através da técnica de Western Blotting**

A técnica de western blotting (Towbin et al. 1979; Burnette 1981; Towbin and Gordon 1984) (TOWBIN, 1993) também pode ser denominada protein immunoblot e consiste na detecção de proteínas específicas em amostras de lisados celulares ou de tecidos. Os passos para a elaboração dessa técnica podem ser resumidos em cinco etapas: (1) extração e quantificação das proteínas; (2) fracionamento das proteínas da amostra em um gel de poliacrilamida; (3) transferências dessas proteínas para uma membrana; (4) incubação da membrana com um anticorpo para detectar a proteína específica a ser analisada; e (5) revelação dessa membrana para análise dos dados. Ela foi realizada no trabalho com a finalidade de determinar os marcadores DAT e IBA nas amostras cerebrais de hipocampo dos animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Carbonato de Lítio e Minociclina.

#### **3.8.1 Extração de proteínas**

O hipocampo foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 100 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma Aldrich, EUA,

1  $\mu$ L de inibidor de protease: 100  $\mu$ L de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

### 3.8.2 Método Bradford para dosagem de proteína

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160  $\mu$ L de amostra e 40  $\mu$ L de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

### 3.8.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 50  $\mu$ g de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e  $\beta$ -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos rat anti- DAT IgG primary antibody (1:1000; Abcam, USA) e rat anti-IBA primary antibody (1:1000; Wako, USA) diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa,



realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc™ Imaging Systems (Biorad, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

### 3.8.4 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do *software* GraphPad Prism versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. Os dados do Protocolo I de experimentos: Curva Dose-Resposta das Alterações Comportamentais e de Estresse Oxidativo Induzidas por GBR 12909 foram analisados com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, nos pontos de tempo de 2,4, 8, 12 h e 24 h. Os dados do Protocolo II de experimentos: Determinação da Atividade Preventiva do Lítio e Valproato em Parâmetros Comportamentais e Antioxidantes da Administração Aguda de GBR 12909 foram analisados de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplo de Tukey. Os dados comportamentais do Protocolo III: Determinação da Atividade de Prevenção e Reversão da Minociclina nos Parâmetros Comportamentais, Antioxidantes e Neuroquímicos de Animais Submetidos ao Modelo de Mania Induzido por GBR 12909 foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey como teste *post hoc* para comparações múltiplas, enquanto que os dados neuroquímicos foram avaliados por ANOVA de uma via com teste de Tukey post hoc. Valores significativos para as análises foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## **4.0 RESULTADOS**

## **CAPÍTULO I**

**GBR 12909 como um modelo animal de mania: curso temporal de alterações comportamentais e oxidativas em áreas cerebrais e efeito de fármacos estabilizadores do humor**

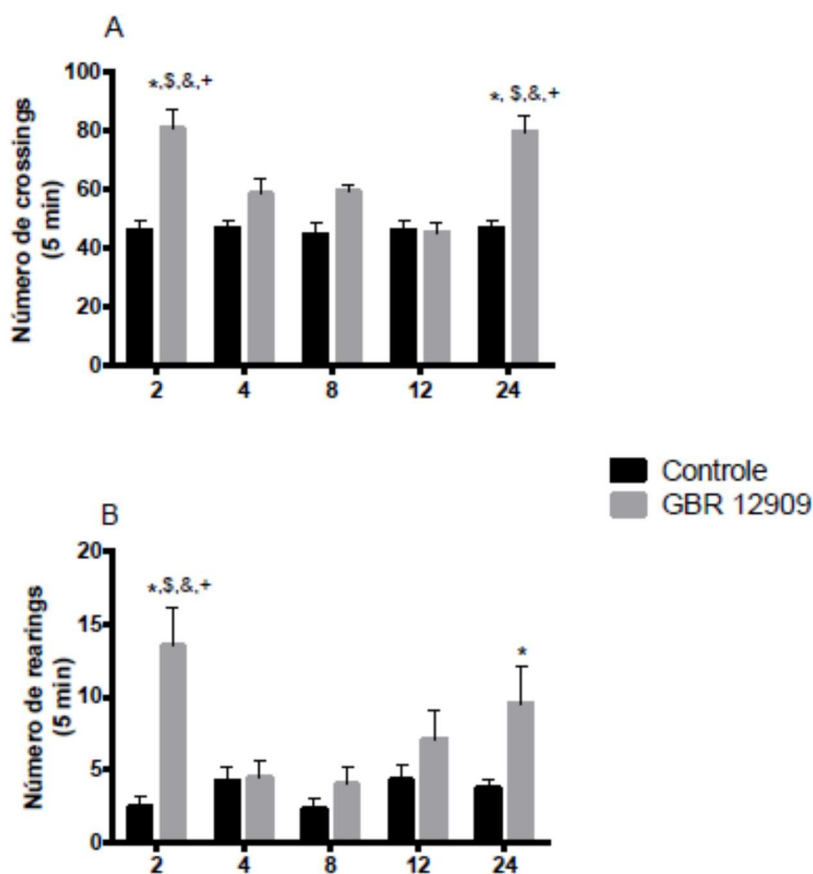
#### 4.0 Capítulo I – GBR 12909 como um modelo animal de mania: curso temporal de alterações comportamentais e oxidativas em áreas cerebrais e efeito de fármacos estabilizadores do humor

##### 4.1 Avaliação do comportamento no campo aberto – *crossings e rearings*

A hiperlocomção horizontal (*crossing*) associada ao aumento da hiperlocomção vertical (*rearing*) são importantes alterações fenotípicas comportamentais freqüentemente avaliadas em modelos animais de mania (MACÊDO et al., 2013). Neste contexto, a análise dos dados do número de cruzamentos (Figura 16) através de ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa "tempo" x "grupo" [F (4, 83) = 6.755,  $p < 0.0001$ ] com efeito principal do "tempo" [F (4, 83) = 7.214,  $p < 0,0001$ ] e "grupo" [F (1, 83) = 50,83,  $p < 0,0001$ ]. O teste post hoc de Tukey mostrou que os animais submetidos a uma única administração de GBR12909 apresentaram um aumento significativo no número de cruzamentos no tempo de 2 h ( $p < 0,0001$ ) e 24 h ( $p < 0,0001$ ) pós-GBR12909 quando comparados ao controle. O aumento do número de cruzamentos nos tempos de 2 e 24 h também foi confirmado pela sua significância estatística quando comparado aos tempos de 4 (P <0,01), 8 (P <0,05) e 12 h (P <0,01 ) pós-GBR 12909.

Na avaliação do comportamento de *rearing* (Fig. 15), a avaliação através de ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa "tempo" x "grupo" [F (4, 83) = 4999,  $p = 0,0012$ ] com efeitos principal do "tempo" [F (4, 83) = 3.774,  $p = 0,072$ ] e "grupo" [F (1, 83) = 24,82,  $p < 0,0001$ ]. A análise post hoc mostrou que os animais submetidos a uma única administração de GBR12909 apresentaram um aumento significativo no número de *rearings* nos tempos de 2 h (P <0,0001) e 24 h (P <0,05) quando comparado ao controle. O maior aumento no comportamento de *rearings* foi observado no tempo de 2 h pós-GBR12909, uma vez que este resultado foi significativo quando comparado aos tempos de 4 h ( $p < 0,01$ ), 8 h ( $p < 0,01$ ) e 12 h ( $p < 0,05$  ) pós-GBR12909.

**Figura 16 - Atividade locomotora horizontal (crossings) e vertical (rearings) no teste de campo aberto dos animais avaliados nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 h após a administração de GBR12909**

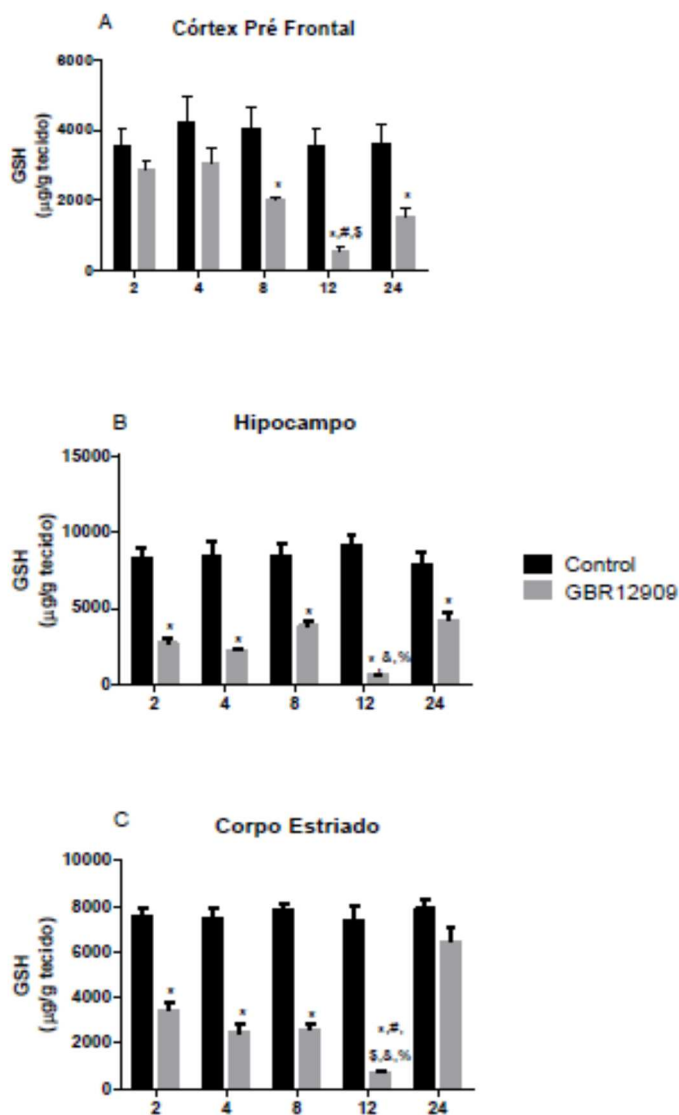


Os animais receberam uma única administração de GBR12909 e foram observados 2, 4, 8, 12 e 24 h após para a determinação do número de crossings (A) e rearings (B) no campo aberto. Cada coluna dos gráficos representa a média  $\pm$  SEM da frequência cruzamentos ou rearings (n = 8-12 animais por grupo para cada ponto de tempo). \*  $P \leq 0,05$  versus controle em cada ponto de tempo respectivo de acordo com ANOVA duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak, \$, &, + $p \leq 0,05$  versus grupo GBR12909 nos pontos de tempo de 2,4, 8, 12 h e 24 h, respectivamente, de acordo com a ANOVA de duas vias seguida teste de comparações múltiplo de Tukey.

#### 4.2 Avaliação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Em relação aos níveis de GSH no CPF (Figura 17), a ANOVA de duas vias revelou efeitos principais significativos de "tempo" [ $F(4, 52) = 3,7782, P = 0,0090$ ] e "grupo" [ $F(1, 52) = 42,36, P < 0,0001$ ]. Os teste post hoc mostrou que, nesta área cerebral, os níveis de GSH diminuíram significativamente nos tempos de 8 ( $p < 0,05$ ), 12 ( $p < 0,0001$ ) e 24 h ( $p < 0,01$ ) pós-GBR12909 quando comparados a cada respectivo controle. A maior diminuição no GSH no CPF foi observada no tempo de 12 h com significância de  $p < 0,01$  quando comparado aos grupos de 2 e 4h. No hipocampo, observou-se uma interação significativa "tempo" x "grupo" [ $F(4, 62) = 4,000, p = 0,0060$ ] com efeito principal significativo de "grupo" [ $F(1, 62) = 187,6, p < 0,0001$ ]. Nesta área do cérebro, uma redução nos níveis de GSH foi observada em todos os tempos pós-GBR12909 quando comparados aos respectivos controles ( $p < 0,0001$ ). A maior diminuição foi observada no tempo de 12 h, com significância de  $p < 0,01$  quando comparado aos grupos de 8 e 24 h. No CE, também observamos uma interação significativa "tempo" x "grupo" [ $F(4, 60) = 9,371, p < 0,0001$ ] com efeitos principais significativos de "tempo" [ $F(4, 60) = 13,12, p < 0,0001$ ] e "grupo" [ $F(1, 60) = 288,8, p < 0,0001$ ]. Os testes post hoc mostraram que os níveis de GSH diminuíram significativamente nos tempos de 2, 4, 8 e 12 h pós-GBR12909 em relação ao controle em cada tempo respectivo ( $p < 0,0001$ ). De forma semelhante ao PFC e hipocampo, a diminuição dos níveis de GSH no CE foi maior no tempo de 12 h pós-GBR12909 (para 2h com significância de  $p < 0,0001$ ; para 4 e 8h com significância de  $p < 0,05$ ).

**Figura 17 - Níveis de glutatona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de animais controle e tratados com GBR 12909 avaliados nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 h pós-GBR12909.**



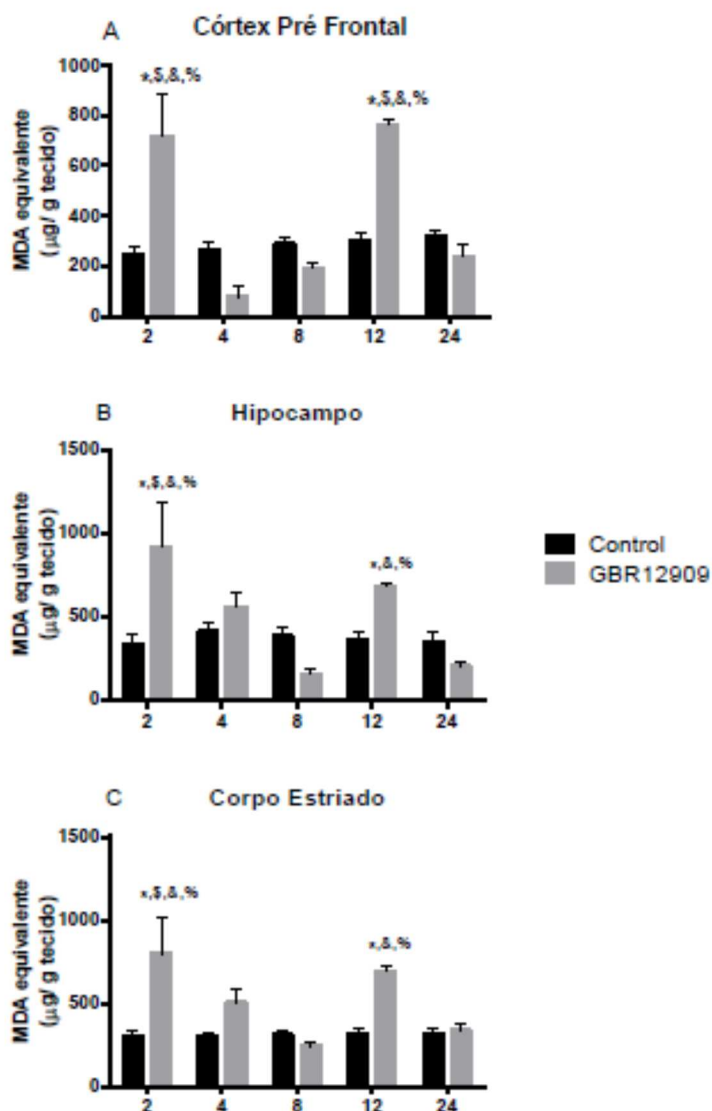
Os animais receberam uma única administração de GBR12909 e foram observados 2, 4, 8, 12 e 24 h após para a determinação dos níveis de GSH no córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C). Cada coluna representa a média ± SEM dos níveis de GSH (controles n = 6-8 animais para cada ponto do tempo; GBR 12909 n = 8 animais para cada ponto do tempo). \* P ≤ 0,05 versus controle em cada ponto de tempo respectivo de acordo com ANOVA de duas vias seguido por teste de comparações múltiplas de Sidak, #, \$, &, % p ≤ 0,05 versus GBR 12909 grupo nos pontos de tempo de 2, 4, 8 e 24 h, respectivamente, de acordo com ANOVA de dois sentidos seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

### 4.3 Avaliação dos níveis de Malondialdeído

Em relação à peroxidação lipídica (Figura 18), no CPF, a ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa "tempo" x "grupo" [ $F(4, 71) = 21,47, p < 0,0001$ ] com os efeitos principais do "tempo" [ $F(4, 71) = 20,08, p < 0,0001$ ] e "grupo" [ $F(1, 71) = 13,67, p = 0,0004$ ]. Os testes post hoc demonstraram aumentos significativos nos níveis de MDA nos tempos de 2 h ( $p < 0,0001$ ) e 12 h ( $p < 0,0001$ ) pós-GBR12909 quando comparados a cada controle respectivo. Em ambos os tempos (2 e 12 h), o aumento da peroxidação lipídica foi significativo quando comparado aos tempos de 4, 8 e 24 h ( $p < 0,0001$ ). Uma situação semelhante foi observada nos HC e CE. Nessas áreas do cérebro observou-se uma interação significativa "de tempo" x "grupo" (HC - [ $F(4, 62) = 7,245, P < 0,0001$ ], ST - [ $F(4, 62) = 5,432, P = 0,0008$ ]), com os principais efeitos de "tempo" e "grupo". A análise post hoc revelou aumentos significativos na peroxidação lipídica nos tempos de 2 ( $p < 0,01$ ) e 12 h ( $p < 0,05$ ) no hipocampo e CE. No tempo de 2 h pós-GBR12909, tanto no hipocampo quanto no CE, o incremento na peroxidação lipídica foi significativo quando comparado aos tempos de 4, 8 e 24 h ( $p < 0,001$ ). No tempo de 12 h, o aumento foi significativo quando comparado a 8 e 24 h ( $p < 0,01$ )



Figura 18 - Níveis de MDA no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de animais controle e tratados com GBR 12909 avaliados nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 h pós-GBR12909.

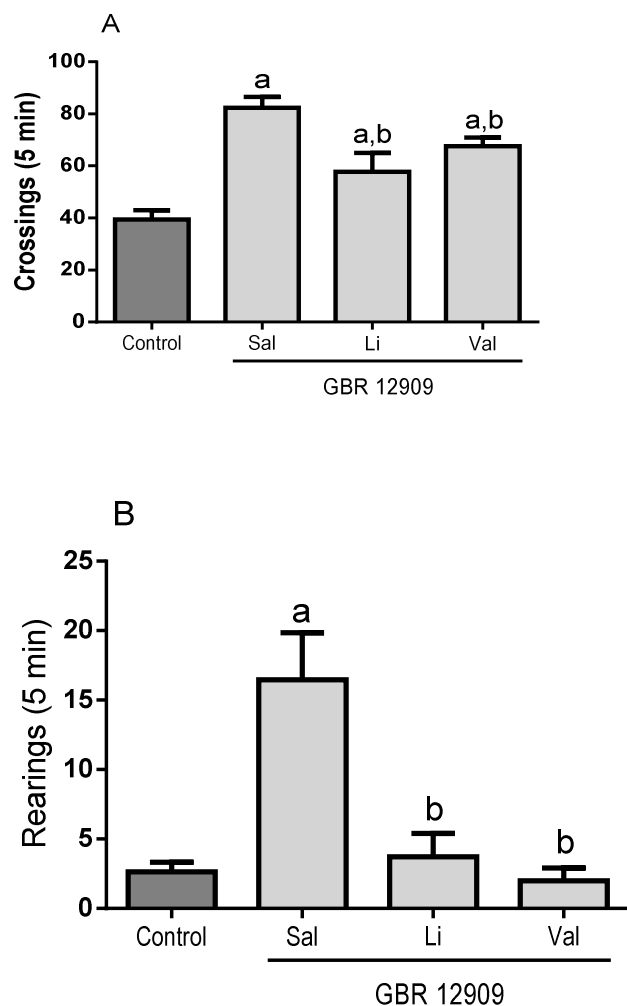


Os animais receberam uma única administração de GBR12909 e foram observados 2, 4, 8, 12 e 24 h após para a determinação dos níveis de MDA no córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C). Cada coluna dos gráficos do córtex pré-frontal, hipocampo e estriado acima representam a média  $\pm$  SEM de níveis de MDA (grupo controle n = 6-8 animais por cada tempo ponto; GBR 12909 (n = 8 animais para cada ponto do tempo). \*  $P \leq 0,05$  versus controle em cada ponto de tempo respectivo de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de comparações múltiplas de Sidak, #, §, δ, %  $p \leq 0,05$  versus GBR 12909 nos pontos de tempo de 2, 4, 8, 12 e 24 h, respectivamente, de acordo com a ANOVA de duas vias seguido do teste de comparações múltiplo de Tukey.

#### **4.4 Determinação da atividade preventiva do lítio e valproato em parâmetros comportamentais da administração aguda de GBR 12909**

A administração de Li impediu significativamente a hiperlocomoção observada no tempo de 2 h pós-GBR 12909 [ $F(3, 35) = 16,84, p < 0,01$ ]. No entanto, o VAL não impediu esta alteração comportamental, mantendo assim o número de cruzamentos, que se apresentou aumentado significativamente quando comparado aos animais controle ( $p < 0,01$ ). O aumento do número de rearings observados 2 h pós-GBR 12909 foi prevenido por ambos os fármacos estabilizadores do humor, Li e VAL [ $F(3, 36) = 8,734, p < 0,01$ ] (Figura 18).

**Figura 19 - Atividade Locomotora no teste de campo aberto de animais pré- tratados durante 3 dias com Lítio ou Valproato e submetidos à administração aguda de GBR 12909**

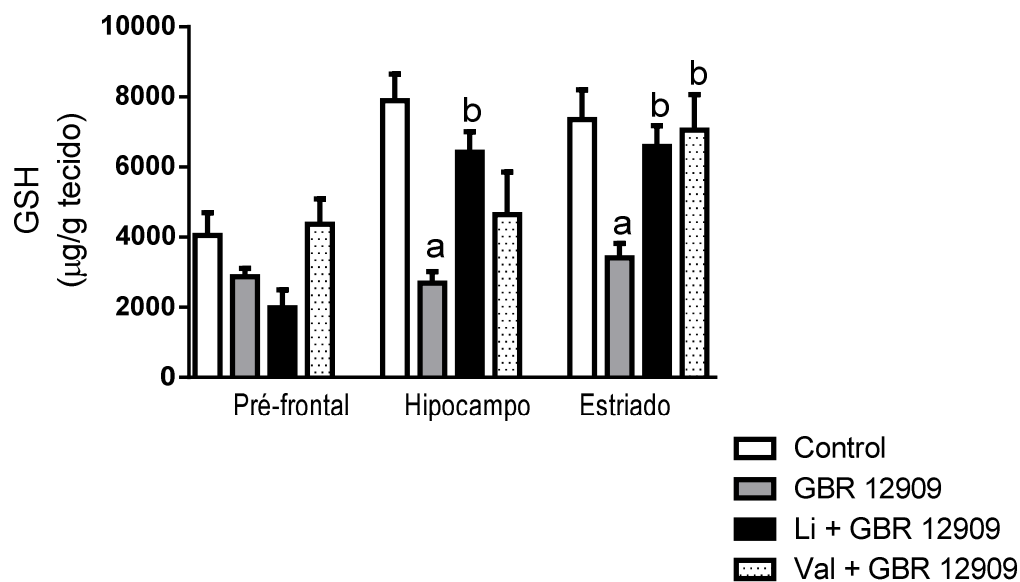


Grupos distintos de camundongos foram tratados por 3 dias com os estabilizadores do humor lítio ou valproato e submetidos a avaliação do número de crossings (A) e rearings (B) duas horas pós-GBR12909. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM do número de cruzamentos  $n = 6-8$  animais / grupo). (a)  $P \leq 0,05$  versus controle e (b)  $P \leq 0,05$  versus GBR 12909 de acordo com ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplo de Tukey.

#### **4.5 Avaliação dos níveis de GSH e MDA em animais submetidos às estratégias de prevenção**

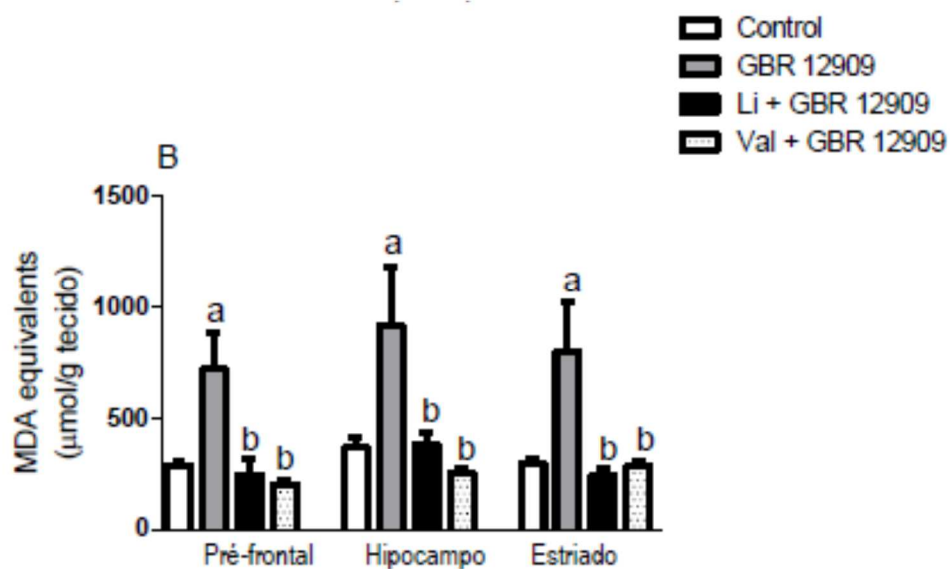
Em relação às alterações pró-oxidantes induzidas por GBR 12909, observamos que Li impediu a diminuição dos níveis de GSH observados 2 h pós-GBR12909 no hipocampo [F (3, 28) = 8,327,  $p < 0,05$ ] e CE [F (3, 25) = 6,076,  $p < 0,05$ ]. O mesmo efeito preventivo foi observado pela pré-administração de VAL apenas no CE ( $p < 0,01$ ) (Figura 20). Ambos os estabilizadores do humor impediram significativamente o aumento da peroxidação lipídica (Figura 21) observada 2 h pós-GBR 12909 no CPF [F (3, 43) = 11,55,  $p < 0,001$ , hipocampo [F (3, 30) = 6,176,  $p < 0,01$ ] e CE [F (3, 34) = 8,764,  $p < 0,01$ ].

**Figura 20** - Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais pré-tratados durante 3 dias com lítio (Li) ou valproato (VAL) e submetidos posterior administração aguda de GBR 12909



Grupos distintos de camundongos foram tratados por 3 dias com os estabilizadores do humor lítio ou valproato e submetidos a avaliação dos níveis de GSH em tecido cerebral duas horas pós-GBR12909. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média dos níveis de GSH (n = 6-8 animais / grupo). (a)  $P \leq 0,05$  versus controle e (b)  $P \leq 0,05$  versus GBR 12909 de acordo com ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

**Figura 21** - Níveis de Malondialdeído (MDA) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais pré-tratados durante 3 dias com lítio (Li) ou valproato (VAL) e submetidos a posterior administração aguda de GBR 12909



Grupos distintos de camundongos foram tratados por 3 dias com os estabilizadores do humor lítio ou valproato e submetidos a avaliação dos níveis de MDA em tecido cerebral duas horas pós-GBR12909. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de MDA ( $n = 6-8$  animais / grupo). (a)  $p \leq 0,05$  versus controle e (b)  $p \leq 0,05$  versus GBR 12909 de acordo com ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

## 4.6 DISCUSSÃO

### 4.6.1 Curva dose-resposta das alterações comportamentais e de estresse oxidativo induzidas por GBR 12909

Os dados aqui apresentados apontam para alterações comportamentais e oxidativas relacionadas com o tempo induzidas pelo inibidor de DAT, GBR 12909. As alterações comportamentais foram mais robustas nos pontos de tempo de 2 e 24 h pós-GBR12909. No entanto, as alterações oxidativas não estavam intimamente relacionadas com as alterações comportamentais. Nesse sentido, observou-se níveis reduzidos de GSH no período de 2 h e 24 h pós-GBR12909 em algumas áreas do cérebro. Por outro lado, os incrementos na peroxidação lipídica foram observados nos pontos de tempo de 2 e 12 h pós-GBR12909. Na avaliação dos animais pré-tratados com os fármacos estabilizadores do humor, observamos que apenas o Li impediu as alterações no número de crossing e rearings. O pré-tratamento com VAL impediu apenas as alterações no comportamento de rearing. Ambos os fármacos que estabilizaram o humor impediram o aumento da peroxidação lipídica induzida por GBR12909, enquanto as alterações nos níveis de GSH foram evitadas apenas pela administração de Li. Em conjunto, nossos resultados mostraram que a administração do inibidor de DAT, GBR12909, é acompanhada por alterações oxidativas do cérebro, dando, portanto, as primeiras evidências para a validade de constructo do modelo. Além disso, é possível expandir a validade preditiva do modelo pela determinação dos efeitos preventivos de Li.

Estudos clínicos evidenciam e reforçam a importância da DAT na fisiopatologia do TAB: i) um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) no rs27072 que afeta a expressão e tradução de RNAm de DAT foi significativamente associado com TAB (PINSONNEAULT et al., 2011b), bem como a presença de múltiplas variantes em DAT1 foi observada para transmitir susceptibilidade ao TAB (GREENWOOD et al., 2006); ii) foi demonstrada uma diminuição nos níveis de RNAm de DAT no córtex pré-frontal post-mortem de pacientes com TAB, em comparação com controles saudáveis (RAO et al., 2007) e iii) maior disponibilidade de DAT significativa em relação aos controles saudáveis no caudado dorsal bilateral de pacientes não medicados com TAB que foram submetidos a imagens de PET com o rádio-traçador seletivo DAT [(11) C] CFT e uma análise de ressonância magnética estrutural (MRI) (ANAND et al., 2011).

De acordo com as evidências clínicas acima mencionadas, os camundongos DAT-KO exibem hiperdopaminergia, com aumento da atividade locomotora e o movimento altamente linearizado em um ambiente inovador, bem como a redução da inibição prepulso do reflexo do sobressalto (PPI), em comparação com os animais selvagem (BARR et al., 2004). Além disso, os ratos DAT-KO exibem um perfil comportamental no monitor de padrões comportamentais (BPM) e um aumento do comportamento de risco que se assemelha a mania do TAB quando comparado a camundongos de tipo selvagem (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). Os medicamentos estabilizadores do humor VAL (RALPH-WILLIAMS et al., 2003) e Li (BEAULIEU et al., 2004) atenuaram as alterações na atividade locomotora observadas em animais DAT-KO.

#### **4.6.2 Alterações oxidativas comportamentais e cerebrais relacionadas ao tempo induzidas pela GBR 12909**

Até o momento, apenas alguns estudos foram baseados na administração do inibidor de DAT GBR12909 para induzir um fenótipo tipo mania. No primeiro estudo foram examinadas diferentes linhagens (C57BL / 6J e 129 / SvJ) de ratos durante 3 h em um BPM. Os resultados deste estudo mostraram que GBR12909 aumentou a atividade dos animais em várias doses testadas, apenas 16 e 28,5 mg / kg inicialmente, mas também 9 mg / kg durante o período de observação de 3 h. Este efeito foi independente da tensão (YOUNG et al., 2010b). No segundo estudo, a administração de GBR12909 aumentou a impulsividade motora, a motivação e a preferência ao risco (ENKHUIZEN et al., 2014). Analisando esses estudos, podemos observar que as alterações comportamentais induzidas por GBR12909 foram avaliadas apenas dentro de 3 h após a administração (YOUNG et al., 2010b).

Em nosso estudo, baseado na ausência de dados na literatura, tentamos expandir esse tempo de observação por um período de 24 horas. Nossos estudos mostraram que o número de crossings e rearings aumentou significativamente pós-GBR12909 em dois pontos de tempo, 2 e 24 h. Vale destacar que o modelo de mania induzido pela administração repetida de d-anfetamina usa o ponto de tempo de 2 h pós d-anfetamina para a condução de avaliações comportamentais e neuroquímicas (FREY et al., 2006c) (MACÊDO et al., 2013).



No que se refere a alteração comportamental que ocorreu no ponto de tempo de 24 h após GBR12909, podemos especular que esse efeito foi devido ao metabólito GBR12909, GBR 12935 (LACERDA et al., 2010). De fato, o GBR12909 é um inibidor de ação prolongada de alta afinidade do transportador de DA que é convertido metabolicamente em humanos em seu análogo relacionado GBR 12935 (LACERDA et al., 2010), um medicamento também conhecido como inibidor de DAT (ANDERSEN; JANSEN; NIELSEN, 1987), sugerido para uso clínico como antidepressivo.

A dopamina é facilmente oxidada enzimaticamente ou não enzimaticamente gerando compostos tais como radicais superóxido e quinonas. Tanto ROS quanto quinonas podem reagir de forma não específica com muitos componentes celulares alterando sua funcionalidade e, portanto, sendo potencialmente neurodegenerativos (MEISER; WEINDL; HILLER, 2013). Um grande corpo de estudos pré-clínicos (FREY et al., 2006c) (MACÊDO et al., 2013) e clínicos (KAPCZINSKI et al., 2008a) apoia o papel do estresse oxidativo na neurobiologia do TAB. Neste contexto, em modelos animais de mania induzidos por anfetaminas, são descritas diminuições na atividade antioxidante do GSH e aumento da peroxidação lipídica em áreas cerebrais como PFC, HC e CE (MACÊDO et al., 2012) (MACÊDO et al., 2013). O desequilíbrio oxidativo também é observado em estudos clínicos com pacientes com TAB (KULOGLU et al., 2002a) (RAFFA et al., 2012). Portanto, sabendo que o próprio metabolismo de DA está fortemente ligado ao estresse oxidativo (MEISER; WEINDL; HILLER, 2013) e na importância do estresse oxidativo para a fisiopatologia do TAB (KAPCZINSKI et al., 2008a), decidimos avaliar os níveis de parâmetros de estresse oxidativo, ou seja, GSH e peroxidação lipídica, e não os níveis de DA em si (uma vez que os aumentos nos níveis de DA do cérebro são esperados após a administração do GBR12909). Esses parâmetros foram avaliados em diferentes pontos de tempo pós-GBR12909 e em áreas cerebrais relacionadas a distúrbios de humor, como PFC, hipocampo e CE (DREVETS; PRICE; FUREY, 2008) com o objetivo de contribuir para a validade de constructo desse modelo animal de mania.

Observamos que o GBR12909 causou alterações de longo prazo nos níveis de GSH, uma vez que os níveis diminuídos deste parâmetro foram observados até 24 h pós-GBR12909 no hipocampo e CPF. Hipocampo e CE foram mais suscetíveis aos efeitos do GBR12909 na redução dos níveis de GSH, uma vez que esta diminuição foi observada

no ponto de tempo de 2 h pós-GBR12909. Quanto à peroxidação lipídica, observamos níveis aumentados deste parâmetro nos pontos de tempo de 2 e 12 h pós-GBR12909.

Vale salientar que observamos uma relação entre o aumento do desequilíbrio oxidativo e alterações comportamentais apenas no ponto de tempo de 2 h pós-GBR12909. Assim, podemos sugerir que GBR12909 na dose de 10 mg/kg causa desequilíbrio oxidativo, uma alteração central observada em pacientes com TAB (FREY et al., 2013b) e em modelos animais de mania (FREY et al., 2006c) (MACÊDO et al., 2013), embora este desequilíbrio não tenha mostrado relação direta com as alterações comportamentais induzidas pelo medicamento (com exceção do período de 2 h pós-GBR12909). O que fortalece essa hipótese quanto ao desequilíbrio oxidativo relacionado ao tempo são os resultados obtidos 12 h pós-GBR12909, pois neste ponto de tempo (12 h), observamos as maiores diminuições nos níveis de GSH seguidas de aumentos na peroxidação lipídica, porém com a ausência de alterações locomotoras.

#### **4.6.3 Determinação da atividade preventiva de lítio e valproato na administração aguda de GBR 12909 como modelo animal de mania**

No geral, como demonstrado anteriormente, observamos uma relação entre alterações oxidativas e comportamentais apenas às 2 h pós-GBR12909. Assim, escolhemos esse ponto de tempo para a avaliação dos animais submetidos a pré-tratamentos com os medicamentos estabilizadores do humor, Li e VAL.

É importante ressaltar que a validade preditiva do modelo de mania induzido por GBR12909 foi avaliada por trabalho anterior pela administração de VAL por 28 dias, seguida de uma administração única de GBR 12909 na dose de 9 mg/kg e avaliação comportamental durante 60 minutos (VAN ENKHUIZEN et al., 2013). Este estudo anterior mostrou que o tratamento crônico com VAL atenuou a hiperatividade induzida por GBR 12909, sem afetar outros parâmetros comportamentais. Em sua conclusão, esses autores chamaram a atenção para a necessidade de estudos usando Li como droga estabilizadora do humor neste modelo, porque o VAL não foi capaz de atenuar todos os aspectos da mania induzida por GBR 12909 (VAN ENKHUIZEN et al., 2013). Os mecanismos de sinalização que medeiam a ação de DA em hiperatividade ainda não são

totalmente compreendidos. Por exemplo, a administração aguda de sais de Li é conhecida por antagonizar a hiperatividade induzida por vários agonistas dopaminérgicos. No entanto, o mecanismo pelo qual o Li interfere com o comportamento associado a DA permanece não elucidado. Um alvo fisiológico do Li, glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), é ativado em resposta à estimulação sustentada dos receptores DA e sua inibição interfere com a expressão de comportamentos dependentes de DA. No entanto, é importante ter em mente que a inibição da GSK-3 pelo carbonato de lítio, ou uma abordagem de segmentação de genes de GSK-3 não pode abolir completamente o comportamento mediado por DA em camundongos (BEAULIEU et al., 2004).

Considerando as alterações oxidativas do cérebro observadas no presente estudo, ambos os medicamentos estabilizadores do humor apresentaram perfil antioxidante. A única situação em que Li era superior a VAL foi no HC onde apenas Li aumentou os níveis de GSH. Recentemente sugeriu-se que a glutathione é essencial para a capacidade do lítio para melhorar a carbonilação de proteína induzida por rotenona, mas não a nitração (NASCIMENTO et al., 2015). Além disso, a produção de estresse oxidativo através de alterações no complexo mitocondrial I, incluindo diminuição da expressão de RNAm, atividade e níveis de proteína tem sido fortemente implicada no TAB (FREY et al., 2013a) (MORETTI et al., 2011).

Em consonância com a importância do estresse oxidativo na fisiopatologia do TAB, foi previamente demonstrado que o aumento das defesas antioxidantes é importante para o mecanismo de drogas estabilizadoras do humor (CUI et al., 2007).

## **CAPÍTULO II:**

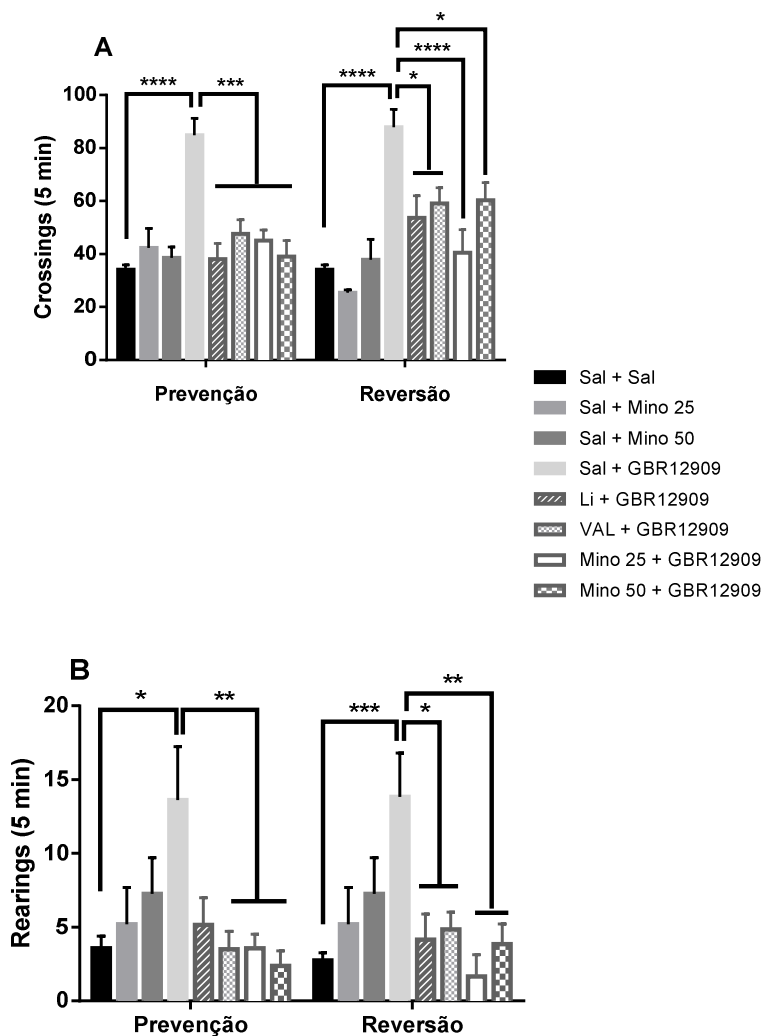
**Efeito da minociclina no modelo de mania induzido por GBR12909 em camundongos: papel de mecanismos antioxidantes e neurotróficos**

## 5.0 Capítulo II - Efeito da minociclina no modelo de mania induzido por GBR12909 em camundongos: papel de mecanismos antioxidantes e neurotróficos

### 5.1 Minociclina previne e reverte hiperlocomoção e comportamento exploratório induzido por GBR12909

A hiperlocomoção e o aumento do comportamento exploratório são características comportamentais da mania em modelos animais (FLAISHER-GRINBERG; EINAT, 2010) (FREY et al., 2006c) (QUEIROZ et al., 2015). Neste estudo, análise de ANOVA de duas vias do número de cruzamentos (atividade locomotora) (Figura 22) revelou uma significativa interação entre os fatores "protocolo" e "tratamento experimental" [F (7, 94)= 2.136, p= 0.0471], com um efeito principal significativo do "tratamento experimental" [F (7, 94) = 16,77, p<0,0001]. Quanto ao *rearing* (atividade exploratória) (Figura 21), observou-se um efeito principal significativo do "tratamento experimental" [F (7, 83) = 8,109, p<0,0001]. O teste post hoc mostrou que, nos protocolos de prevenção e de reversão o tratamento com GBR12909 induziu um aumento significativo em locomoção (p< 0,0001) e comportamento exploratório (p< 0,05) quando comparado aos animais controle. No protocolo de prevenção, Li, VAL, Mino 25 ou 50 significativamente impediram a hiperlocomoção induzida por GBR12909 (p< 0,001). A respeito do comportamento exploratório, VAL, Mino 25 ou Mino 50 impediram significativamente o aumento no número de rearings induzido por GBR12909 (p< 0,01). No protocolo de reversão, Li (P <0,05), VAL (P <0,05), Mino25 (P <0,0001) ou Mino50 (P <0,05) reverteram significativamente a hiperlocomoção induzida por GBR12909. O aumento do *rearing* induzido por GBR12909 (p< 0,001) foi significativamente revertido por todos os tratamentos testados: Li (p< 0,05), VAL (p< 0,05), Mino25 (p< 0,01) ou Mino50 (p< 0,01).

**Figura 22** - Efeito da Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão da hiperlocomoção induzidos pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos.



Grupos de camundongos Swiss foram administrados repetidamente com GBR12909 e submetidos ao pré- ou pós-tratamento com estabilizadores do humor ou Mino e avaliados no campo aberto quanto ao número de crossings (A) e número de rearings (B). Cada barra representa a média  $\pm$  SEM do número de cruzamentos ( $n= 6-8$  animais por grupo). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$  de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey.

## 5.2 A minociclina previne e reverte o aumento do comportamento de risco induzido pelo GBR 12909

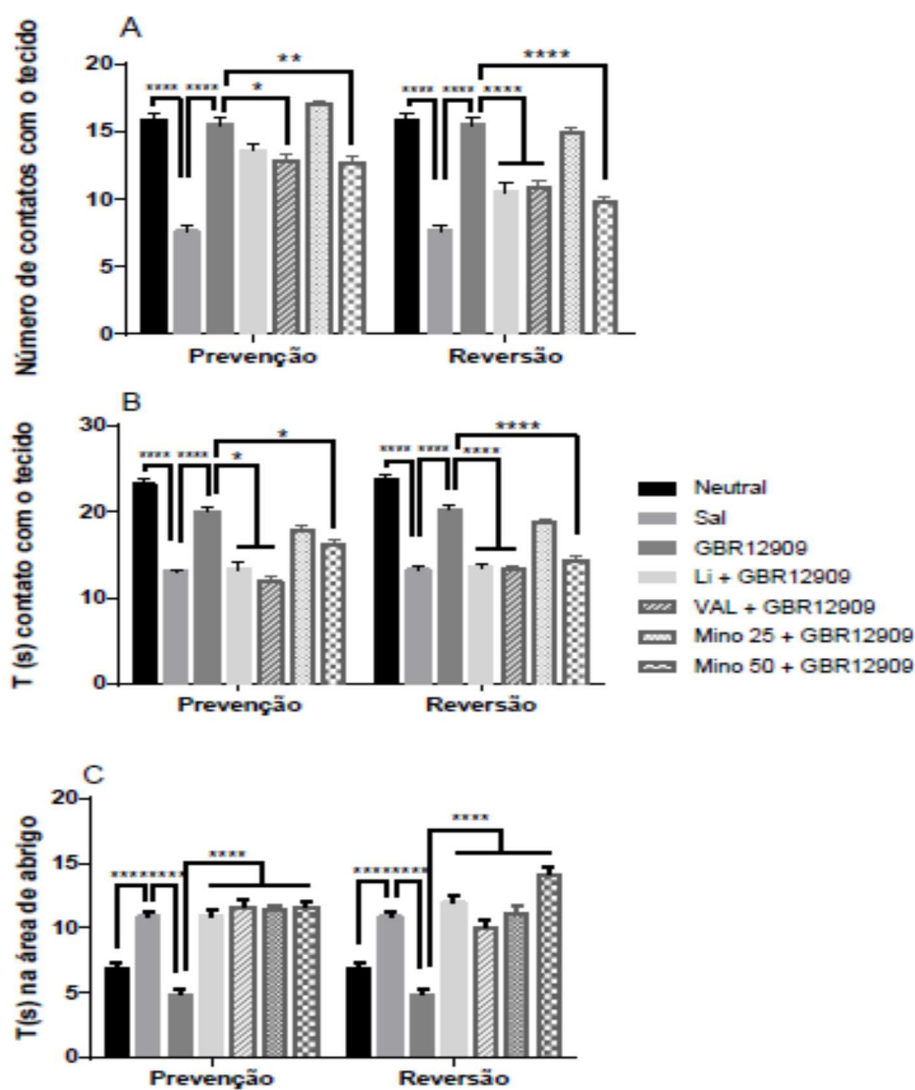
O comportamento impulsivo com perda da avaliação de risco são aspectos críticos da mania e um dos critérios diagnósticos de acordo com o DSM-IV (SWANN et al., 2009). A inclusão da avaliação do comportamento da impulsividade / risco no rastreio de domínios relacionados à mania em modelos animais foi encorajado nos últimos anos (ENKHUIZEN et al., 2014) (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011).

Neste estudo, nós avaliamos o comportamento de risco através da exposição dos camundongos ao odor de um predador (gato), como previamente definido (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001a). (KIRSTEN et al., 2011). Na análise do número de contatos no pano (Figura 23), detectamos uma significativa interação entre "protocolo" e "tratamento experimental" [F (6, 97) = 3,812, p= 0,0019], com um efeito principal significativo de "protocolo" [F (1, 97) = 27,93, p< 0,0001] e "tratamento experimental" [F (6, 97) = 72,84, p<0,0001]. A respeito de o tempo de contato do pano (Figura 23), um efeito principal significativo de "experimental tratamento "foi detectado [F (6, 95) = 106,1, p< 0,0001]. Em relação à duração dos eventos de abrigo (Figura 23), uma interação significativa entre os fatores foi observada [F (6, 98) = 2,965, p= 0,0105], com um efeito principal significativo de "Tratamento experimental" [F (6, 98) = 59,67, p<0,0001]. Nos protocolos (prevenção e reversão), o tempo e o número de contatos com o pano do gato foram reduzidos no grupo tratado com solução salina quando comparados ao odor neutro (p< 0,0001). O tratamento com GBR12909 prejudicou a resposta natural aversiva de camundongos, aumentando estes parâmetros em relação ao grupo tratado com solução salina (p< 0.0001). Quanto à duração dos eventos de abrigo, animais tratados com solução salina apresentaram um aumento neste parâmetro quando exposto ao odor do gato em comparação com odor neutro (p< 0,0001). Pelo contrário, os animais tratados com GBR12909 mostraram uma redução nos eventos de abrigo quando comparado ao grupo tratado com solução salina (p< 0.0001). No protocolo de prevenção VAL (p<0,05) ou Mino50 (p<0,01) reduziram o aumento do número de contatos de tecido induzido pelo GBR12909. Li, VAL ou Mino50 impediu o aumento do tempo de contato de tecido induzido por GBR12909 (p< 0,05). No protocolo de reversão, Li, VAL ou Mino50 reverteram com sucesso tanto o aumento do tempo quanto o número de contatos com o pano com o odor do gato com animais induzidos ao modelo tipo mania por GBR12909 (p< 0,0001). Vale ressaltar que a menor dose de Mino (25 mg / kg) não impediu ou

reverteu os efeitos de GBR12909 no tempo e número de contatos do pano. Em relação aos eventos de abrigo, Li, VAL, Mino 25 ou Mino 50 aumentaram a duração desses eventos em ambos os protocolos de tratamento em comparação com o grupo tratado com GBR12909 ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 23** - Efeito de Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão do comportamento de risco no teste de odor de gato induzidos pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos.



Grupos de camundongos Swiss foram administrados repetidamente com GBR12909 e submetidos ao pré- ou pós-tratamento com estabilizadores do humor ou Mino e avaliados no teste do odor do gato quanto ao número de contatos com o tecido (A), tempo (s) de contato com o tecido (B) e tempo (s) na área do abrigo (C). Cada barra representa a média dos parâmetros avaliados no teste do odor do gato ( $n = 7-8$  animais por grupo)  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  de acordo com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Tukey 's.

### 5.3 Níveis de Glutathiona

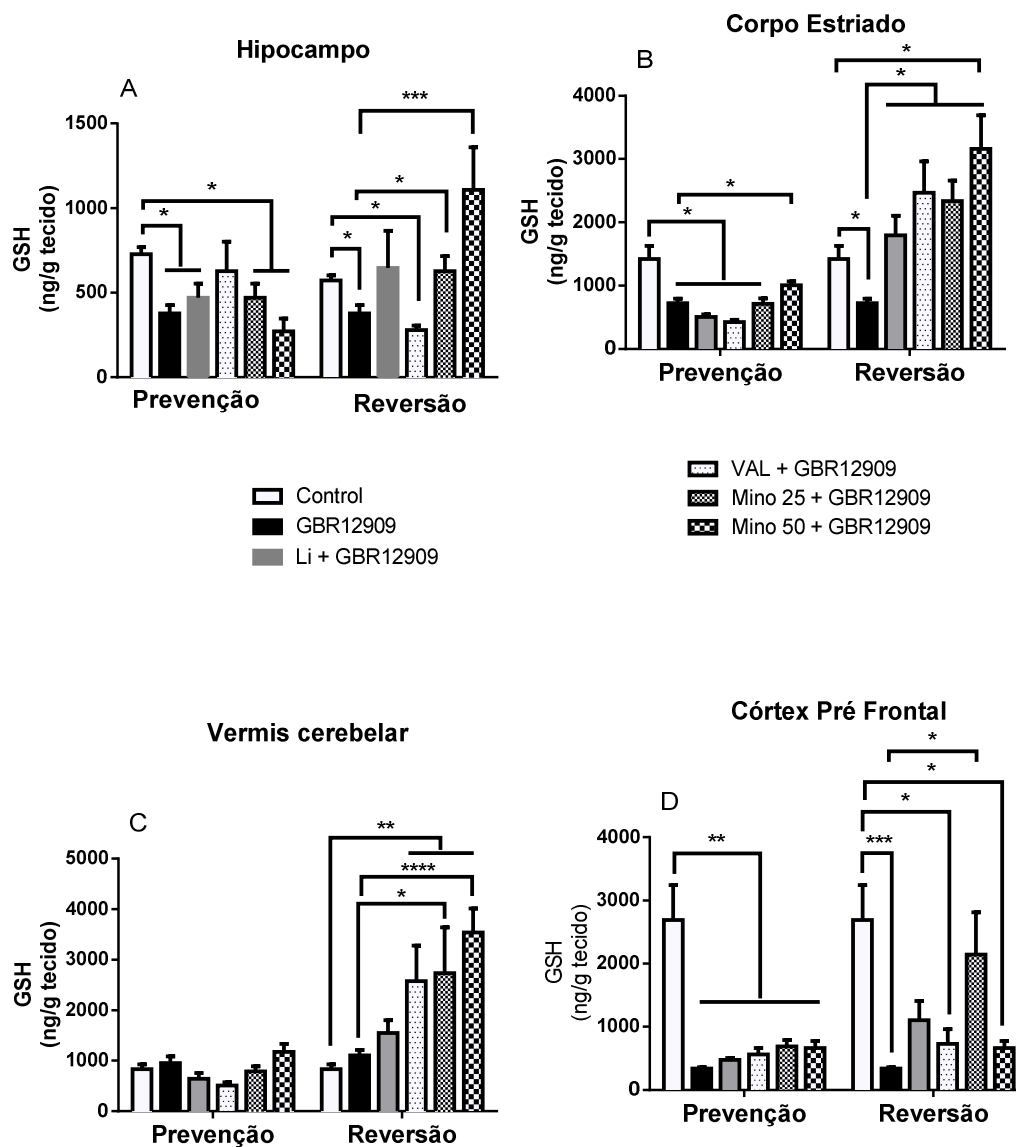
A Mino reverteu a diminuição do conteúdo de GSH cerebral induzido por GBR12909. Através da análise por ANOVA de duas vias observou-se o efeito significativo do "tratamento experimental" [ $F(1, 33) = 38,42, p < 0,0001$ ]. No protocolo de prevenção, a análise post hoc mostrou uma redução significativa no conteúdo de GSH do hipocampo no grupo tratado com GBR12909 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 24). Nenhum dos medicamentos testados (Li, VAL, Mino25 ou Mino50) impediu as alterações nos níveis de GSH induzidos por GBR12909 no hipocampo. No protocolo de reversão, o grupo tratado com GBR12909 apresentou redução nos níveis de GSH no hipocampo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O tratamento com Mino 25 ( $p < 0,05$ ) ou Mino 50 ( $p < 0,001$ ) reverteu significativamente essa redução nos níveis de GSH do hipocampo causados pelo GBR12909. Além disso, no protocolo de reversão o grupo pós-tratado com Mino 50 apresentou aumento nos níveis de GSH do hipocampo em relação aos animais controle ( $p < 0,05$ ).

No estriado (Figura 24), a análise de ANOVA de duas vias revelou efeito principal significativo dos fatores "tratamento experimental" [ $F(5, 97) = 7,804, p < 0,0001$ ] e "Protocolo" [ $F(1, 97) = 72,04, p < 0,0001$ ] com interação significativa entre os fatores [ $F(5, 97) = 9,338, p < 0,0001$ ]. O teste post hoc mostrou uma redução nos níveis de GSH no CE de animais tratados com GBR12909 em ambos protocolos de prevenção e reversão em relação aos controles ( $p < 0,05$ ). Além disso, no protocolo de prevenção, os tratamentos testados (Li, VAL, Mino25 ou Mino50) mantiveram a diminuição dos níveis de GSH estriatal induzido por GBR12909 quando em comparação com os controles ( $p < 0,05$ ). Pelo contrário, no protocolo de reversão o tratamento com todas as drogas testadas reverteu significativamente a diminuição do teor de GSH no estriado induzido por GBR12909 + Sal ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo GBR12909 + Mino50 apresentou aumento nos níveis de GSH estriatal quando comparado aos controles ( $p < 0,05$ ). Na vermis cerebelar (Figura 24), detectamos uma interação significativa entre o fatores [ $F(5, 103) = 5,425, p = 0,0002$ ] com um efeito principal significativo do "protocolo" [ $F(1, 103) = 42,92, P < 0,0001$ ] e "tratamento experimental" [ $F(5, 103) = 6,399, p < 0,0001$ ].

No protocolo de prevenção, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Por outro lado, no protocolo de reversão, um aumento significativo nos níveis de GSH foi detectado nos grupos tratados com VAL + GBR12909

( $p < 0,05$ ), Mino25 + GBR12909 ( $p < 0,05$ ) ou Mino50 + GBR12909 ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo GBR12909 + Sal. Vale ressaltar que não houve diferença significativa no conteúdo do GSH na vermis cerebelar observado no protocolo de prevenção ou reversão em animais tratados com GBR12909 em comparação com os controles salinos. No CPF (Figura 24) houve um efeito principal significativo de "tratamento experimental "[F (5, 116) = 12,63,  $p < 0,0001$ ]. No protocolo de prevenção, a análise post hoc mostrou uma redução significativa nos níveis de GSH nos grupos Sal + GBR12909, Li + GBR12909, VAL + GBR12909, Mino25 + GBR12909 ou Mino50 + GBR12909 ( $p < 0,01$ ) em comparação com o grupo controle. No protocolo de reversão, foi detectada uma diminuição significativa nos níveis de GSH em GBR12909 + Sal nos animais tratados quando comparados aos controles ( $p < 0,001$ ). O tratamento com GBR12909 + VAL ou GBR12909 + Mino50 ( $p < 0,05$ ) indicou diminuição significativa dos níveis de GSH no CPF em relação ao grupo controle, enquanto GBR12909 + Mino25 aumentou os níveis de GSH quando comparado ao grupo GBR12909 + Sal.

**Figura 24** - Efeito da Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão das alterações em níveis reduzidos de glutatona (GSH) induzidas pela administração repetida de GBR – 12909 em camundongos



Grupos de camundongos Swiss foram administrados repetidamente com GBR12909 e submetidos ao pré- ou pós-tratamento com estabilizadores do humor ou Mino e avaliados quanto aos níveis de GSH no hipocampo (A), corpo estriado (B), vermis cerebelar (C) e córtex pré – frontal (D). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n= 6-8 animais por grupo). \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001 de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey.

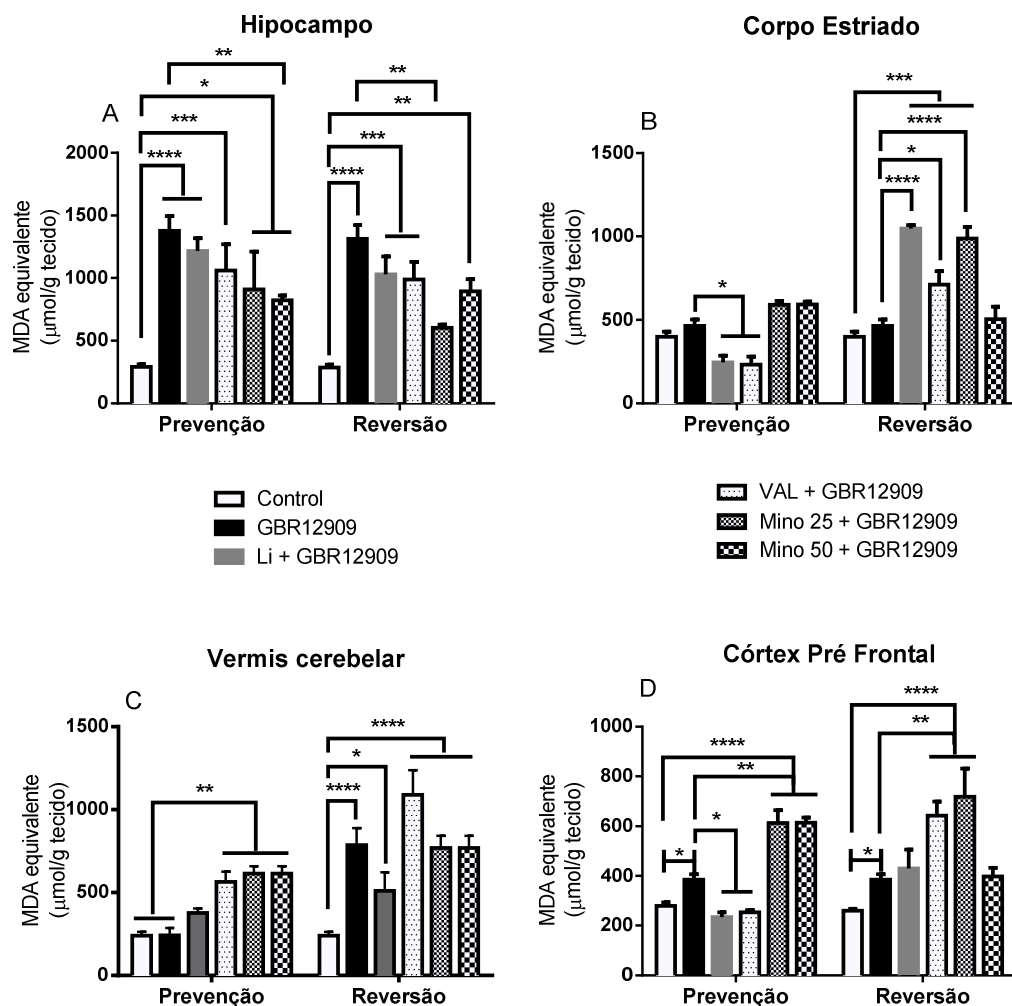
#### 5.4 Níveis de peroxidação lipídica

A análise da peroxidação lipídica do hipocampo (Figura 25), representada aqui por níveis de MDA, revelou um significativo efeito principal de "tratamento experimental" [ $F(5, 80) = 35,05, p < 0,0001$ ]. No teste post hoc, observamos que o tratamento com Sal + GBR12909 induziu um aumento significativo nos níveis de MDA quando em comparação com os controles nos protocolos de prevenção e reversão ( $p < 0,0001$ ). Além disso, o grupo pré-tratado com os medicamentos testados manteve o aumento induzido por GBR12909 em relação aos animais controle. Somente o tratamento com Mino 50 (grupo Mino50 + GBR12909) reduziu significativamente a peroxidação lipídica quando comparado aos animais tratados com GBR12909 ( $p < 0,05$ ).

No protocolo de reversão o pós-tratamento com Li, VAL e Mino50 manteve o aumento dos níveis de MDA induzidos pelo GBR12909. Somente Mino25 (grupo Mino25 + GBR12909) apresentou redução da peroxidação lipídica no hipocampo em relação ao grupo GBR12909 + Sal ( $p < 0,01$ ). No estriado (Figura 25), uma interação significativa entre os fatores foi observado [ $F(5, 80) = 27,08, p < 0,0001$ ]. No protocolo de prevenção, os grupos pré-tratado com Li ou VAL diminuiu significativamente os níveis de MDA quando comparado com Grupo Sal + GBR12909 ( $P < 0,05$ ). No protocolo de reversão observamos aumento da peroxidação lipídica estriatal nos grupos administrados Li, VAL ou Mino 25 quando comparado a GBR12909 + Sal ou grupo controle. No vermis cerebelar (Figura 25) houve também uma interação significativa entre os fatores [ $F(5, 82) = 5,836, p = 0.0001$ ].

Nossos resultados revelaram aumento da peroxidação lipídica cerebelar no grupos de prevenção VAL + GBR12909, Mino25 + GBR12909 ou Mino50 + GBR12909 e grupos de reversão GBR12909 + Sal, Li + GBR12909, VAL + GBR12909, Mino25 + GBR12909, Mino50 + GBR12909 em relação aos animais de controle. No CPF (Figura 25), também foi observada uma interação significativa entre fatores [ $F(5, 91) = 10,50, p < 0,0001$ ]. No protocolo de prevenção, a peroxidação lipídica pré-frontal induzida por GBR12909 foi prevenida pela administração de Li ou VAL, enquanto o pré-tratamento com Mino25 ou 50 aumentou esse parâmetro em relação ao controle e animais tratados com GBR12909. No protocolo de reversão, a peroxidação lipídica no pré-frontal aumentou em animais tratados com GBR12909, e o tratamento com VAL ou Mino25 também demonstrou aumento da peroxidação lipídica quando comparado ao animais controle tratados com GBR12909.

**Figura 25** - Efeito da Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão das alterações na peroxidação lipídica induzidas pela administração repetida de GBR - 12909 em camundongos



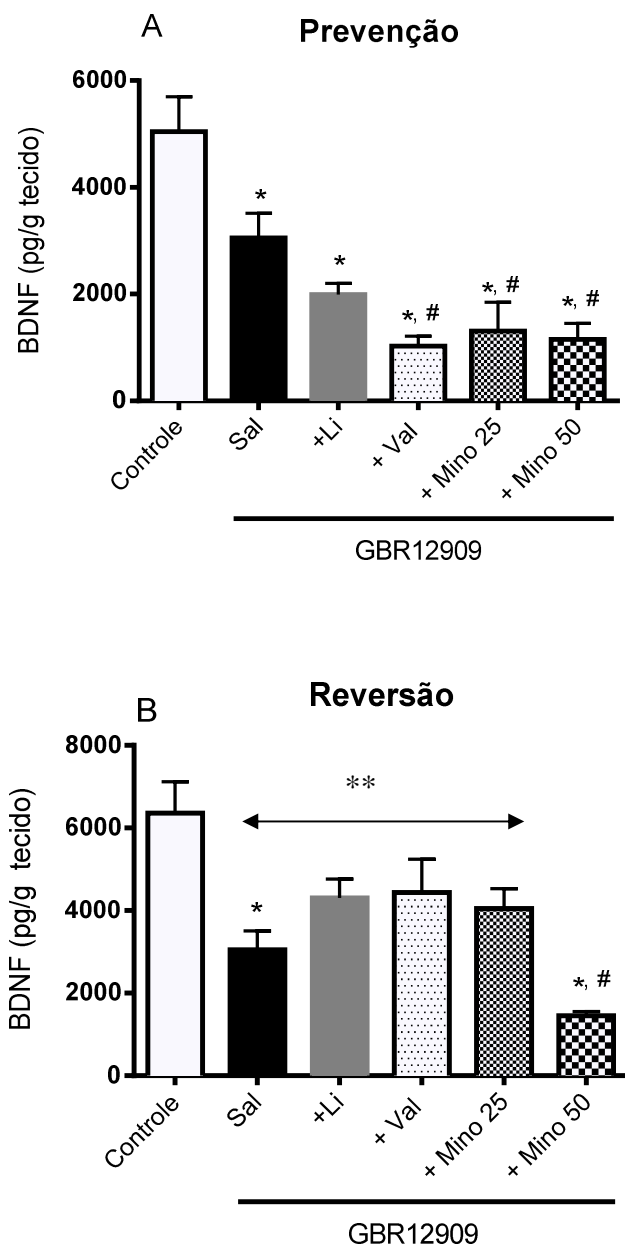
Grupos de camundongos Swiss foram administrados repetidamente com GBR12909 e submetidos ao pré- ou pós-tratamento com estabilizadores do humor ou Mino e avaliados quanto aos equivalentes de MDA no hipocampo (A), corpo estriado (B), vermis cerebelar (C) e córtex pré - frontal (D). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n= 6-8 animais por grupo). \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001 de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey.

### 5.5 Níveis de BDNF

A minociclina reverteu a diminuição dos níveis de BDNF do hipocampo induzidos por GBR12909 conforme ilustrado na Figura 26 . No protocolo de prevenção, a administração de GBR12909 diminuiu significativamente os níveis de BDNF do hipocampo quando em comparação com os controles [F (5, 28) = 12,60,  $p < 0,0001$ ]. Mino25 ( $p < 0,0001$ ), Mino 50 ( $p < 0,0001$ ), Li ( $p < 0,0001$ ) ou VAL ( $p < 0,0001$ ), não conseguiram evitar a diminuição dos níveis de BDNF induzidos por GBR12909 em comparação com o grupo controle. Observou-se também uma diminuição significativa nos conteúdos de BDNF nos grupos pré-tratados com VAL, Mino 25 e Mino50 quando comparados ao GBR12909 ( $p < 0,05$ ).

No protocolo de reversão, os animais tratados com GBR12909 apresentaram um redução significativa nos níveis de BDNF no hipocampo em relação aos controles [F (5,29) = 6999,  $p = 0,0002$ ]. O tratamento com Li ( $p < 0,05$ ), VAL ( $p < 0,05$ ) ou Mino 25 ( $p < 0,05$ ) aumentaram significativamente os níveis de BDNF quando comparados ao grupo tratado com GBR12909.

**Figura 26** - Efeito da Minociclina (Mino) e estabilizadores do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão das alterações no fator neurotrófico derivado do cérebro do hipocampo (BDNF) no protocolo de prevenção e reversão induzido pela administração repetida de GBR-12909.



Grupos de camundongos Swiss foram administrados repetidamente com GBR12909 e submetidos ao pré- ou pós-tratamento com estabilizadores do humor ou Mino e avaliados quanto aos níveis hipocámpais de BDNF. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n= 6-8 animais por grupo). \*P <0,05, \*\* P <0,01 versus controle, #p<0,05 vs GBR12909 + Sal de acordo com a ANOVA de duas vias, seguido teste post-hoc de Tukey.



## 5.6 Discussão

Neste estudo observamos que a administração repetida do inibidor de DAT, GBR12909 induz alterações comportamentais relacionadas à mania, como hiperlocomoção e comportamento de risco. Estas alterações comportamentais foram acompanhadas por diminuição dos níveis de GSH (no hipocampo, CE e CPF), níveis aumentados de peroxidação lipídica (no hipocampo, vermis cerebelar e CPF) e níveis hipocampais reduzidos de BDNF em animais tratados com GBR12909.

Os estabilizadores do humor Li e VAL além da Mino25 e Mino50 impediram e reverteram a hiperlocomoção e alterações de rearing induzidas por GBR12909. Além disso, ambos os medicamentos estabilizadores do humor e a Mino 25 e Mino 50 também impediram e reverteram as alterações induzidas pelo GBR12909 em alguns parâmetros relacionados ao comportamento de risco. Considerando as alterações oxidativas e neurotróficas avaliadas no presente estudo observou-se que Li, VAL e Mino foram mais efetivos na reversão de alterações de GSH induzidas por GBR12909 no estriado. A respeito de peroxidação lipídica a Mino foi mais eficaz na prevenção e reversão destas alterações no hipocampo, enquanto que Li e VAL impediram essa alteração no estriado e o CPF. Li, Val e Mino25 reverteram a diminuição dos níveis de BDNF induzidos por GBR12909.

Logo, uma análise em conjunto dos nossos dados sugere maiores estudos moleculares relacionados a atividade do GBR12909 na indução do modelo animal de mania, mas porventura, indica que a Mino pode ser uma nova ferramenta promissora para o tratamento dos TAB, apresentando um grande potencial para aplicação de testes em ambiente clínico.

### 5.6.1 Alterações comportamentais de hiperatividade e comportamento de risco induzidas por GBR12909 e efeitos da mino

Até o presente momento pouco se sabe a respeito dos mecanismos etiológicos subjacentes ao TAB. Nas últimas décadas, dados atraentes postularam o conceito de síndrome de desregulação da dopamina no TAB (BERK et al., 2007). Este modelo teórico propõe a existência de um desequilíbrio na neurotransmissão dopaminérgica no TAB, caracterizado por um aumento cíclico da dopamina no estado agudo da mania, seguida de uma secundária diminuição na sensibilidade do receptor dopaminérgico e mudanças no

funcionamento do transportador de DA ao longo do tempo (BERK et al., 2007). Isso leva a períodos de diminuição da transmissão dopaminérgica, correspondendo a alguns aspectos da fase depressiva e a repetição do ciclo. Esta regulação ascendente e descendente pode ser mediada por mecanismos homeostáticos endógenos, explicando o grande curso de variabilidade interindividual em doenças (BERK et al., 2010). Na última década, a Mino foi proposta como um potencial agente para tratar transtornos neuropsiquiátricos. Em estudos experimentais, centrais e sistêmicos a administração de Mino exerce efeitos semelhantes aos antidepressivos em ratos submetidos ao estresse cronológico imprevisível (RÉUS et al., 2015) e em modelo de depressão relacionados ao desamparo (ARAKAWA et al., 2012). Mino também reduziu o comportamento de sensibilização e hiperlocomoção induzidas por psicoestimulantes, tais como metanfetamina (SMITTKAMP et al., 2014) (ZHANG et al., 2006) e cocaína (CHEN; UZ; MANEV, 2009), também como déficits atenuados no giro sensório-motor (inibição de prepulso) induzida por MK-801 (LEVKOVITZ et al., 2007). Em ambiente clínico, os recentes ensaios clínicos controlados com placebo demonstraram eficácia da Mino como terapia adjuvante para depressão bipolar com bons resultados (HUSAIN et al., 2017) (SAVITZ et al., 2012). Além disso, alguns ensaios clínicos piloto relataram o potencial do Mino para tratar os sintomas da depressão unipolar (MIYAOKA et al., 2012) e depressão unipolar refratária (HUSAIN et al., 2015).

No presente estudo, demonstramos a capacidade do Mino de prevenir e reverter o fenótipo comportamental maníaco (comportamento de hiperatividade e comportamento de risco) induzido pela administração repetida do inibidor seletivo DAT, GBR12909, em camundongos. A hiperatividade é uma característica da mania. Vários estudos utilizaram a medida da atividade locomotora e exploratória para descrever os efeitos de drogas dopaminérgicas / psicoestimulantes, como as anfetaminas, como modelos de mania (FLAISHER-GRINBERG; EINAT, 2010); (MACÊDO et al., 2012) (VALVASSORI et al., 2008). Além disso, drogas estabilizadoras do humor, Li e VAL, geralmente podem suprimir essas alterações, apoiando a validade preditiva desses modelos (FLAISHER-GRINBERG; EINAT, 2010) (MACÊDO et al., 2013).

Nos últimos anos, a administração aguda de GBR12909 foi reconhecida como um modelo animal de mania. Em consonância com esta evidência, os camundongos foram tratados de forma aguda com GBR12909 e quando analisado seu padrão comportamental,

apresentaram atividade locomotora aumentada e comportamentos perseverantes em combinação com o aumento da exploração, um perfil semelhante visto em pacientes com mania do TAB (YOUNG et al., 2010b). Além disso, no capítulo anterior, observamos hiperlocomoção, bem como comportamento exploratório aumentado 2 e 24 horas após administração aguda de GBR12909, estes dados encontram-se publicados (QUEIROZ et al., 2015). Considerando que a mania é uma síndrome complexa e multifacetada, a investigação de múltiplos domínios como o afetivo e cognitivo tem proposto uma bateria de testes comportamentais para avaliação do modelo tipo mania em animais (LOGAN; MCCLUNG, 2016). Neste contexto, a redução da ansiedade e impulsividade são características importantes da mania que geralmente têm um manejo clínico difícil e estão associados com altas taxas de suicídio (IZCI et al., 2016) (SWANN et al., 2005). No comportamento de roedores, ansiedade e avaliação de risco podem ser avaliadas pela exposição a uma condição ambiental aversiva. Neste contexto, paradigmas de ameaça, como a exposição ao odor de gato, provocam robustez e caracterizam mudanças no comportamento defensivo que se pensa refletir frente ao comportamento de medo e ansiedade em roedores (BOWEN et al., 2013) (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001b).

Com base nessa premissa, neste estudo, decidimos avaliar os efeitos da administração GBR12909 repetida, pela primeira vez, no paradigma do odor do predador, bem como para testar a capacidade da Mino e drogas clássicas de estabilização do humor Li e VAL na prevenção e reversão dos efeitos induzidos por GBR12909. Em nossas condições experimentais, os ratos tratados com veículo passaram menos tempo em contato com o pano com odor do gato em comparação com o pano de controle, além de produzir menos contatos. Os camundongos controle também exibiram mais eventos de abrigo quando expostos ao pano de gato em comparação com a situação neutra. Esses achados demonstram que, em condições normais quando submetidas ao odor do gato, os camundongos percebem fisiologicamente esses estímulos como aversivos e ansiogênicos. Evidências anteriores demonstram que em testes de tradução cruzada para avaliar a impulsividade e o comportamento de risco em camundongos, como o jogo do teste de Iowa, inibidores seletivos DAT, como o modafinil e GBR12909, promovem um aumento da impulsividade, motivação e preferência de escolha de risco. Curiosamente, outros fármacos psicoestimulantes, como a anfetaminas, quando testados nessas condições geralmente desencadeiam uma resposta ansiogênica / aversiva (VAN ENKHUIZEN et al., 2013). O perfil distinto de drogas como as anfetaminas teve seu mecanismo múltiplo

não seletivo no SNC, atribuído seu mecanismo a vários alvos de neurotransmissão monoaminérgica, como transportadores de serotonina e receptores noradrenérgicos, além de sua ação em neurotransmissores dopaminérgicos (VAN ENKHUIZEN et al., 2013). Portanto, nossos dados reforçam a capacidade do GBR12909 através da inibição de DAT para induzir comportamento de risco relevante para o estudo da mania do TAB observados em contextos clínicos. Além de também ser uma possibilidade para investigar em modelos animais o estudo da impulsividade, comportamento de risco e comportamento tipo de adição ao jogo, o que clinicamente é observado em pacientes medicados para Doença de Parkinson.

É bem reconhecido que Li é a droga psicotrópica de primeira linha para o controle de impulsividade e capacidade de suicídio na população com TAB, um efeito que não parece ser exclusivamente por sua capacidade de diminuir o transtorno do humor (BENARD et al., 2016) (CIPRIANI et al., 2013). Em animais de laboratório, evidências consideráveis também apoiam a ação anti-impulsividade de Li (HALCOMB; GOULD; GRAHAME, 2013) (OHMURA et al., 2012). Em relação aos fármacos anticonvulsivantes, como carbamazepina, lamotrigina e Val, apesar de alguns relatos de sua eficácia no tratamento e prevenção de comportamento impulsivo e suicídio ((HOLLANDER et al., 2003) (STANFORD et al., 2005), alguns estudos destacaram sua inferioridade em comparação com Li nas populações com TAB (CALABRESE et al., 2005) (KEMP et al., 2009). No presente estudo, demonstramos que ambos os medicamentos estabilizadores do humor, Li e VAL apresentaram um perfil similar, prevenindo e revertendo as alterações induzidas pelo GBR12909 no paradigma do odor de gato. É importante notar que estudos pré-clínicos prévios testando os efeitos de Li e fármacos anticonvulsivantes em modelos de comportamento impulsivo e de risco apenas avaliaram os efeitos da administração aguda de fármaco único. Além disso, a impulsividade é uma construção complexa e de domínio múltiplo (EVENDEN, 1999), 1999; (NAUTIYAL et al., 2017), portanto, é possível que algumas drogas possam ser efetivas contra alguns aspectos de impulsividade e ineficazes contra outros.

Em nossos resultados, Mino principalmente na dose mais elevada (50 mg/kg) atenuou os efeitos do GBR12909 no paradigma do odor de gato em protocolo de prevenção e reversão. A menor dose de Mino (25 mg/kg) suprimiu parcialmente a alterações, aumentando apenas o número de eventos de abrigo. Apesar da sua potencial

eficácia como terapia adjuvante na redução de sintomas depressivos no TAB e sintomas negativos / cognitivos na esquizofrenia, não há relatos considerando os efeitos da Mino contra impulsividade ou comportamento suicida em pesquisa pré-clínica ou clínica. Portanto, nosso estudo mostra novas evidências sobre os possíveis efeitos benéficos da Mino contra a impulsividade e perturbações observadas no TAB e outros transtornos neuropsiquiátricos, sendo, portanto, a Mino uma forte candidata para o tratamento do estado maníaco agudo, e também para a profilaxia da recaída de sintomas maníacos.

### **5.6.2 Estresse oxidativo e níveis de bdnf e sua relação com os efeitos da Mino**

No presente estudo, os efeitos benéficos do Mino contra as alterações induzidas por GBR12909 incluíram efeitos comportamentais acompanhados de alterações importantes no equilíbrio oxidativo. A prevenção e / ou reversão das alterações também foram observadas nos grupos administrados com as drogas estabilizadoras do humor em áreas específicas do cérebro. Como previamente mencionado, o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de vários transtornos neuropsiquiátricos, sendo especialmente importante para o TAB (KAPCZINSKI et al., 2008b)(TUN??EL et al., 2015). Vários estudos relataram que os pacientes com TAB têm significantes alterações em enzimas antioxidantes (KULOGLU et al., 2002b) (KUNZ et al., 2008) (SELEK et al., 2015), aumento da peroxidação lipídica (KULOGLU et al., 2002b) (KUNZ et al., 2008) (TSAI; HUANG, 2015) e diminuição do conteúdo de GSH no plasma e cérebro. Parece que essas alterações pró-oxidativas estão presentes em todas as fases do TAB, incluindo eutimia, mas atingindo seus níveis mais altos no estado maníaco (KUNZ et al., 2008).

### **5.6.3 A inibição do DAT, o consequente aumento da dopamina e de alterações oxidativas**

Os níveis sinápticos de DA estão relacionados ao aumento do estresse oxidativo (YAMATO et al., 2010). De fato, as vias enzimáticas ou não enzimáticas responsáveis pelo metabolismo da DA, podem gerar compostos potencialmente pró-oxidantes. Neste estudo, observamos que a administração repetida de GBR12909 induziu uma diminuição importante nos níveis de GSH e aumento da peroxidação lipídica em todas as áreas cerebrais testadas, especialmente no CPF e no hipocampo. Nosso grupo de pesquisa demonstrou no capítulo 1 do presente estudo que uma única administração de GBR12909 induziu um aumento da peroxidação lipídica e redução dos níveis de GSH no hipocampo

e CE de ratos 2 e 24 horas pós-administração, que foi associado à hiperlocomoção (QUEIROZ et al., 2015). Mais recentemente, (KHAN et al., 2017) demonstraram que o tratamento com GBR12909 em camundongos adolescentes promoveu um aumento nos níveis de 8-oxo-dG, um marcador de DNA oxidado, em CPF, além de uma diminuição em neurônios imunorreativos à parvalbumina nesta área do cérebro (KHAN et al., 2017).

Em nossos resultados, a Mino atenuou parcialmente as alterações oxidativas cerebrais induzidas por GBR12909. Sabe-se que Mino tem propriedades neuroprotetoras (DEAN et al., 2012b) e estudos prévios destacaram suas importantes propriedades antioxidantes, tanto pela supressão e eliminação direta de radicais livres (KRAUS et al., 2005) (MORIMOTO et al., 2005). Apesar de não ser totalmente entendido, um mecanismo sugerido para as propriedades antioxidantes da Mino reside no seu efeito regulatório no metabolismo da energia cerebral, principalmente, através de seus efeitos nos complexos mitocondriais I, II, III e IV em áreas límbicas (RÉUS et al., 2015). Em um estudo anterior, Mino na dose de 40 mg/kg atenuou significativamente o aumento nos níveis extracelulares de DA estriatal após administração de MDMA (ZHANG et al., 2006). Portanto, apesar de não termos avaliado diretamente aqui, reforçamos a hipótese de que os efeitos protetores da Mino contra danos oxidativos causados por GBR12909 podem estar relacionados à sua ação na neurotransmissão monoaminérgica, especialmente na via dopaminérgica.

Outro ponto que procuramos determinar foi se os efeitos da Mino poderiam estar relacionados com as alterações do BDNF no hipocampo, já que esse marcador é de suma importância na fisiopatologia do TAB. De fato, níveis anormais periféricos de BDNF são observadas em indivíduos com esse transtorno, levando à proposição desta neurotrofina como um biomarcador de episódios de humor e progressão no TAB (FERNANDES et al., 2011). Além disso, é importante mencionar que uma diminuição progressiva da expressão de BDNF é observada no hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania com base na administração de anfetamina (por 7 e 35 dias), que pode ser suprimida pelo tratamento com estabilizador do humor (FRIES et al., 2015). Conseqüentemente, em nossos resultados, descobrimos que o bloqueio repetido de DAT por GBR12909 induziu uma diminuição acentuada nos níveis de BDNF do hipocampo independentes de protocolo de tratamento. Li, VAL e Mino com a dose mais baixa (25 mg / kg) restauraram a concentração hipocampal de BDNF semelhantes aos níveis de controle. Apesar da Mino

estar potencialmente envolvida em efeitos protetores no protocolo de reversão, podemos indicar a hipótese de mecanismos subjacentes à ação de Mino na prevenção, onde o protocolo pode estar relacionado a outros mecanismos independentes do BDNF.

### **CAPÍTULO III:**

**Avaliação da memória de trabalho, comportamentos relacionados a ansiedade e avaliação da expressão protéica de DAT e IBA em animais submetidos ao modelo de mania induzido pela administração repetida de GBR12909 e tratados com estabilizadores do humor e minociclina**

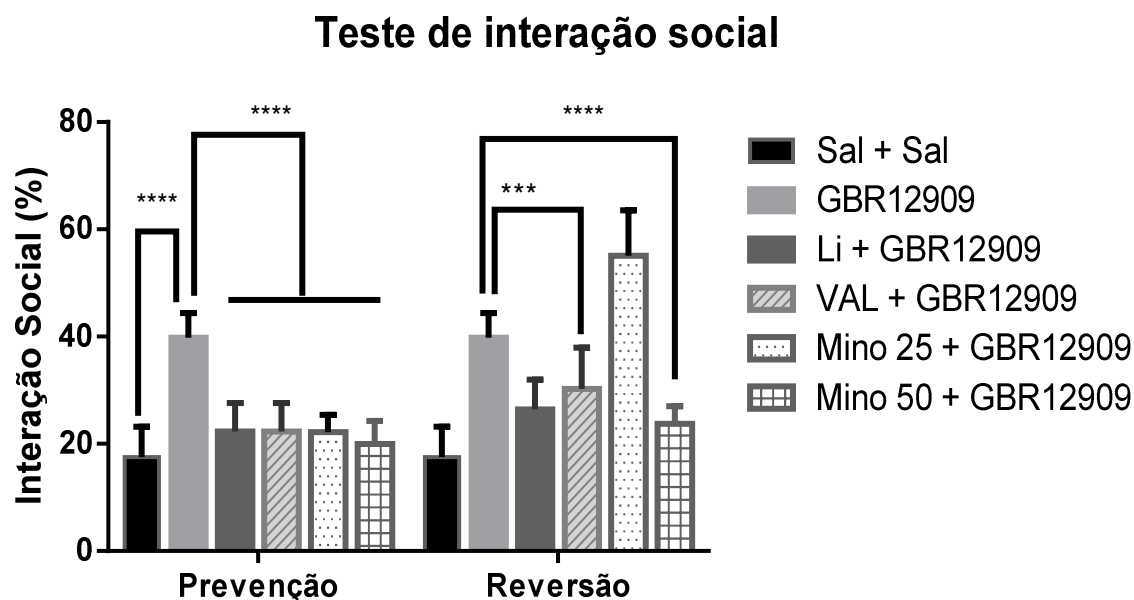


### **6.0 III: Avaliação da memória de trabalho, comportamentos relacionados a ansiedade e avaliação da expressão protéica de DAT e IBA em animais submetidos ao modelo de mania induzido pela administração repetida de GBR12909 e tratados com estabilizadores do humor e minociclina**

#### **6.1 A Mino preveniu e reverteu as alterações causadas pelo GBR 12909 em camundongos avaliados no teste de interação social**

O teste de interação social teve como objetivo avaliar a interação do animal com um animal desconhecido. Detectamos uma significativa interação entre "protocolo" e "tratamento experimental" [ $F(5, 82) = 18,87, P < 0,0001$ ], com um efeito principal significativo de "protocolo" [ $F(1, 82) = 51,35, P < 0,0001$ ] e "tratamento experimental" [ $F(5, 82) = 43,89, P < 0,0001$ ]. Nos protocolos (prevenção e reversão - Figura 27), o grupo tratado com GBR12909 aumentou a interação social quando comparado ao grupo salina ( $p < 0,0001$ ). No protocolo de prevenção os grupos tratados com Li, VAL, Mino25 e Mino50 conseguiram diminuir a interação social comparados ao grupo GBR12909 ( $p < 0,0001$ ), levando esta interação a nível de animais controle. No protocolo de reversão, Li, VAL e Mino50 conseguiram reverter a interação social quando comparados com animais induzidos ao modelo de mania induzido por GBR12909 ( $p < 0,0001$ ). Já a dose de Mino25 não conseguiu reverter as alterações na interação social quando comparado ao grupo GBR12909.

**Figura 27** - Efeito de Minociclina (Mino) e drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão nas alterações de interação social induzidas pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos.

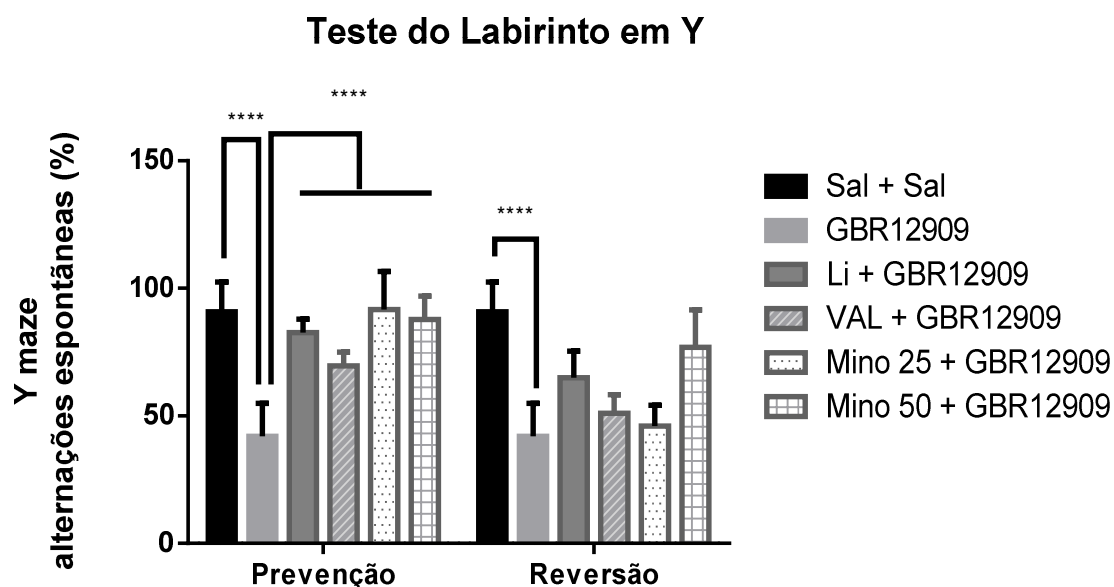


Camundongos Swiss foram submetidos aos protocolos de reversão e prevenção, com drogas estabilizadoras do humor e Mino, de comportamento tipo-mania induzido por GBR12909 e avaliados quanto a interação social. Cada barra representa a média  $\pm$  SEM da porcentagem de interação social (n= 6-8 animais por grupo). \*\*\* P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001 de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey.

## **6.2 A minociclina preveniu as alterações espontâneas no teste de Y-maze de animais tratados com GBR 12909**

O teste do labirinto em Y visou avaliar a memória de trabalho dos animais submetidos ao modelo de mania por GBR 12909 e tratados com Li, Val ou Mino. Detectamos uma significativa interação entre "protocolo" e "tratamento experimental" [ $F(5, 93) = 8,575, P < 0,0001$ ], com um efeito principal significativo de "protocolo" [ $F(1, 93) = 53,37, P < 0,0001$ ] e "tratamento experimental" [ $F(5, 93) = 49,77, P < 0,0001$ ]. Nos protocolos (prevenção e reversão), o grupo tratado com GBR12909 diminuiu o número de alterações espontâneas (Figura 28) quando comparado ao grupo salina ( $p < 0.0001$ ). No protocolo de prevenção os grupos tratados com Li, Val, Mino25 e Mino50 conseguiram aumentar o número de alterações espontâneas quando comparados ao grupo GBR12909 ( $p < 0.0001$ ). No protocolo de reversão, Li, Val, Mino 25 e Mino50 não conseguiram reverter as alterações no número de alterações espontâneas induzidas pelo modelo de mania induzido por GBR12909.

**Figura 28** - Efeito da Minociclina (Mino) e de drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (Val) na prevenção ou reversão de alterações na memória executiva induzida pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos no teste de Y-maze.

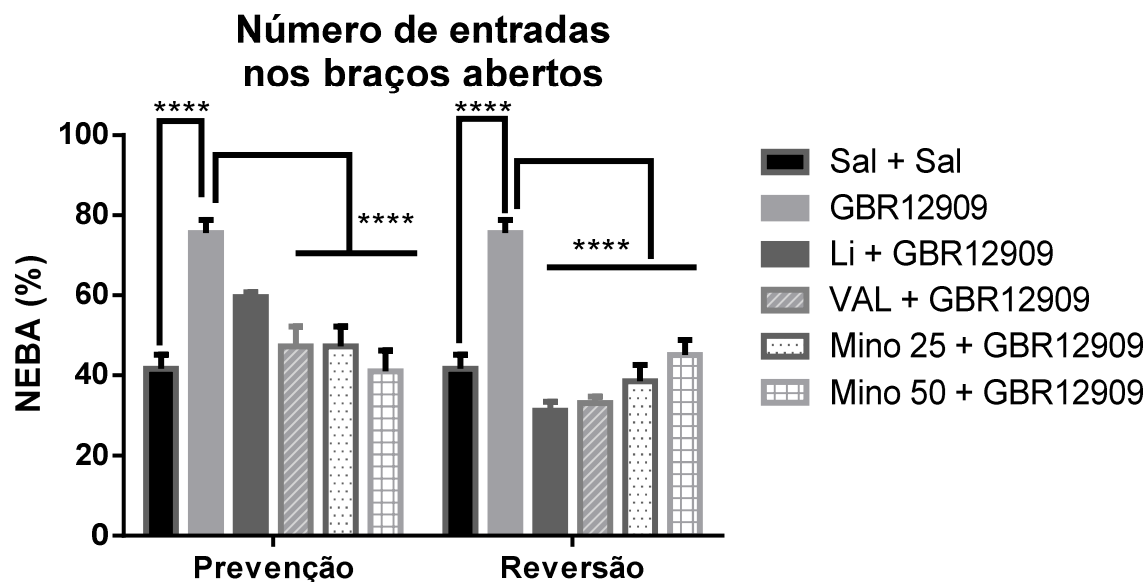


Camundongos Swiss foram submetidos aos protocolos de reversão e prevenção, com drogas estabilizadoras do humor e Mino, de comportamento tipo-mania induzido por GBR12909 e avaliados quanto as alterações espontâneas no teste de labirinto em Y. Cada barra representa a média  $\pm$  SEM da porcentagem da alternância correta entre os braços no teste de Y-maze (n= 6-8 animais por grupo). \*\*\* P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001 de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey.

### **6.3 A Mino conseguiu prevenir e reverter a alteração no número de entradas nos braços abertos de camundongos no teste do labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado, visou avaliar o comportamento de risco e ansiedade dos animais submetidos aos protocolos de tratamento com GBR 12909, Li, Val e Mino, através do parâmetro de número de entradas nos braços abertos (NEBA) (Figura 29). Detectamos uma interação não significativa entre "protocolo" e "tratamento experimental" [ $F(5, 86) = 2,116, p = 0,0711$ ], também sem efeito significativo de "protocolo" [ $F(1, 86) = 1,383, p = 0,2429$ ], porém com significância no "tratamento experimental" [ $F(5, 86) = 47,01, p < 0,0001$ ]. Nos protocolos (prevenção e reversão), o grupo tratado com GBR12909 aumentou o NEBA quando comparado ao grupo salina ( $p < 0,0001$ ). Nos protocolos de prevenção e reversão os grupos tratados com Li, Val, Mino25 e Mino50 conseguiram diminuir o NEBA quando comparados ao grupo GBR12909 ( $p < 0,0001$ ).

**Figura 29** - Efeito de Minociclina (Mino) e de drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão de alterações no número de entradas nos braços abertos induzidas pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos

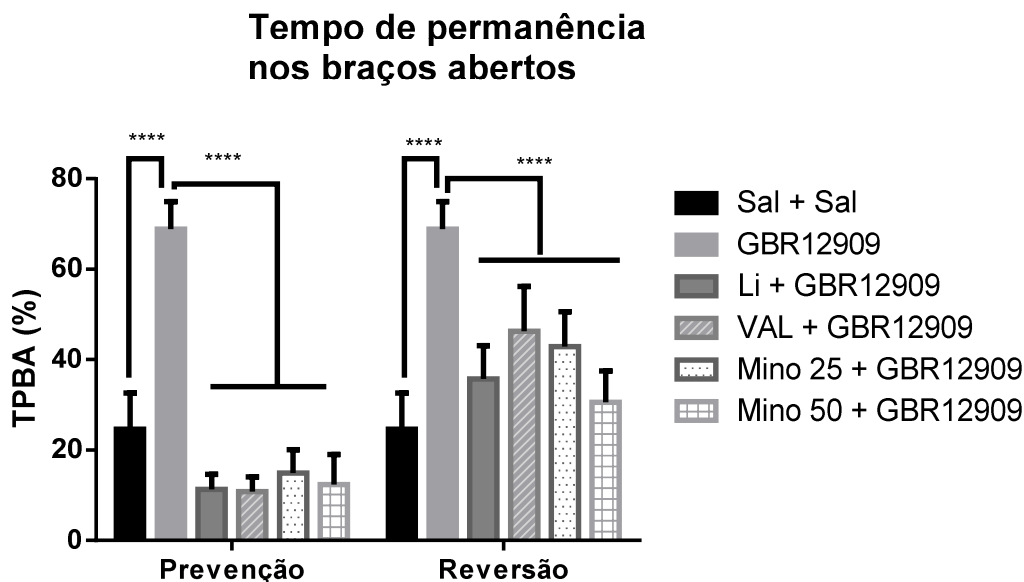


Camundongos Swiss foram submetidos aos protocolos de reversão e prevenção, com drogas estabilizadoras do humor e Mino, de comportamento tipo-mania induzido por GBR12909 e avaliados quanto ao número de entrada nos braços abertos (NEBA) no labirinto em cruz elevado. Cada barra representa a média  $\pm$  SEM da porcentagem de entrada nos braços abertos ( $n= 6-8$  animais por grupo). \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$  de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey.

#### **6.4 A Mino conseguiu prevenir e reverter o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado**

Detectamos uma interação significativa entre "protocolo" e "tratamento experimental" [  $F(5, 85) = 19,73, P < 0,0001$  ], com efeito significativo de "protocolo" [  $F(1, 85) = 164,5, P = 0,0001$  ], e com significância no "tratamento experimental" [  $F(5, 85) = 122,7, P < 0,0001$  ] (Figura 30). No protocolo de prevenção e reversão, o grupo tratado com GBR12909 aumentou o percentual do tempo de permanência nos braços abertos (%TPBA) quando comparado ao grupo salina ( $p < 0,0001$ ). No protocolo de prevenção os grupos tratados com Li, Val, Mino25 e Mino50 conseguiram diminuir o %TPBA quando comparados ao grupo GBR12909 ( $p < 0,001$ ) e ao grupo salina ( $p < 0,001$ ). Também no protocolo de reversão os grupos tratados com Li, Val, Mino25 e Mino50 reverteram as alterações induzidas por GBR12909 quando comparados ao grupo GBR12909 ( $p < 0,0001$ ).

**Figura 30** - Efeito de Minociclina (Mino) e de drogas estabilizadoras do humor, lítio (Li) ou valproato (VAL) na prevenção ou reversão no percentual do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) induzido pela administração repetida de GBR-12909 em camundongos no teste de labirinto em cruz elevado.



Camundongos Swiss foram submetidos aos protocolos de reversão e prevenção, com drogas estabilizadoras do humor e Mino, de comportamento tipo-mania induzido por GBR12909 e avaliados quanto ao percentual do tempo de permanência nos braços abertos (%TPBA). Cada barra representa a média  $\pm$  SEM da porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (n= 6-8 animais por grupo). \*\*\* P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001 de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey.

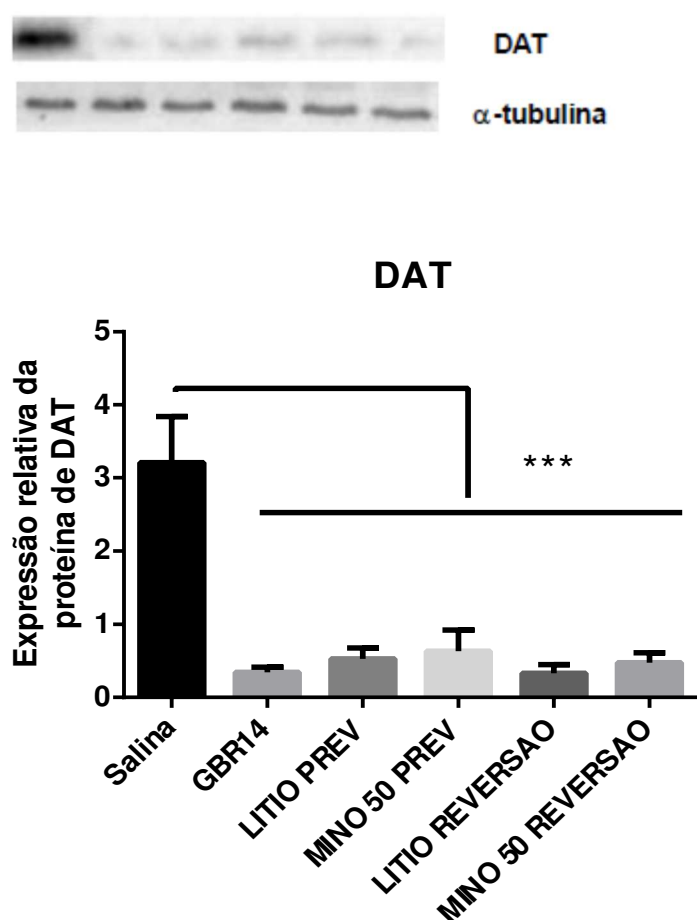


## 6.5 Expressão das proteínas DAT e IBA1 no hipocampo dos animais tratados com GBR12909

### 6.5.1 Expressão da proteína DAT

O tratamento repetido com GBR12909 causou uma redução significativa na expressão proteica do DAT em relação aos animais tratados com salina [ $F(5, 12) = 14,12$ ,  $P < 0,05$ ] (Figura 31). Mino 50 e Li não conseguiram prevenir nem reverter a redução do DAT causada por GBR12909.

**Figura 31** - Efeito da Minociclina e da droga estabilizadora do humor, lítio (Li) na prevenção ou reversão das alterações na expressão do transportador de dopamina (DAT) no hipocampo em animais sob o protocolo de prevenção e reversão induzido pela administração repetida de GBR-12909.

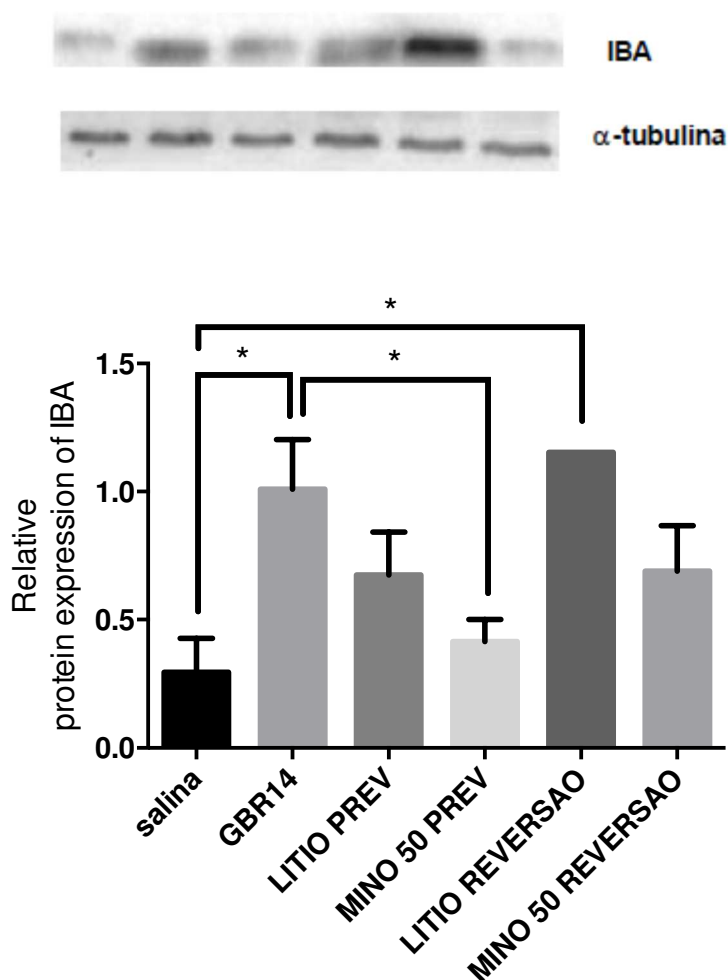


Camundongos Swiss foram submetidos aos protocolos de reversão e prevenção, com lítio e Mino, de comportamento tipo-mania induzido por GBR12909 e avaliados quanto a expressão proteica do DAT. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM ( $n = 4$  animais por grupo). \*  $P < 0,05$  versus controle, de acordo com a ANOVA de uma via, seguido do teste Brown-Forsythe

### 6.5.2 Expressão da proteína IBA1

O tratamento repetido com GBR12909 causou aumento significativo na expressão do IBA1. O tratamento preventivo com Mino causou uma redução significativa deste parâmetro em relação ao grupo GBR12909. O grupo reversão tratado com Li manteve o aumento nos níveis de IBA1 induzido por GBR12909 (Figura 32).

**Figura 32** - Efeito da Minociclina (Mino50) e a droga estabilizadora do humor, lítio (Li) na prevenção ou reversão das alterações na expressão do IBA no hipocampo em animais sob o protocolo de prevenção e reversão induzido pela administração repetida de GBR-12909.



Camundongos Swiss foram submetidos aos protocolos de reversão e prevenção, com lítio e Mino, de comportamento tipo-mania induzido por GBR12909 e avaliados quanto a expressão proteica de IBA1. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n= 4 animais por grupo). \* P< 0,05 versus controle, de acordo com a ANOVA de uma via, seguido do teste Brown-Forsythe

## **6.6 Discussão**

### **6.6.1 Alterações cognitivas, de ansiedade, comportamento de risco e interação social induzidas por GBR12909 e efeitos da Mino**

Pacientes com TAB sofrem de comprometimento cognitivo que influencia significativamente suas atividades funcionais (SAITO et al., 2017), estas alterações cognitivas são observadas principalmente durante a progressão do TAB (MARTINO et al., 2017). Vale destacar que apesar da alta taxa de ansiedade em pacientes com TAB, durante o episódio de mania os pacientes encontram-se mais propícios a condutas de risco, o que pode estar relacionada a uma baixa ansiedade e aumento dos contatos sociais. Nesse contexto, nosso estudo se propôs em avaliar os efeitos da administração GBR12909 repetida, no teste de labirinto em y (Y-maze), labirinto em cruz elevado (plus-maze) e interação social, bem como a testar o potencial da Mino e estabilizadores de humor clássicos como Li e VAL na prevenção e reversão dos efeitos induzidos por GBR12909.

### **6.6.2 Minociclina previne alterações induzidas por GBR12909 no teste de Y-maze**

Na avaliação da memória de trabalho pelo teste de Y-maze observou-se que a Mino nas doses de 25 e 50 preveniu as alterações na memória de trabalho induzidas pelo GBR12909. Esse resultado corrobora com o estudo de (NADERI et al., 2017) em que a Mino na dose de 40mg/kg conseguiu prevenir as alterações de memória em animais com isquemia cerebral induzida pelo processo cirúrgico de oclusão da artéria carótida (NADERI et al., 2017). No presente trabalho os estabilizadores do humor, VAL e Li, que também apresentaram atividade preventiva nas alterações de memória induzidas por GBR12909, corroborando com estudos que relatam o potencial do Lítio no controle da cognição e melhora da memória de trabalho (TSALTAS et al., 2007) e da atividade terapêutica do Val nas funções cognitivas e de memória de ratos com modelo animal de Alzheimer (NALIVAEVA et al., 2012).

### **6.6.3 Minociclina previne alterações induzidas por GBR12909 no teste de interação social**

No TAB, estudos indicam uma menor capacidade de interação social em indivíduos portadores do transtorno (OWEN et al., 2016), podendo esse fato ser relacionado às oscilações de humor presentes. Entretanto, observa-se que na depressão há menor predisposição ao contato social, enquanto na mania o paciente se apresenta com alta expressão da fala e de busca de contato com outras pessoas, comportamento similar ao de mania que é observado em modelos animais tratados com anfetamina (MANDUCA et al., 2016). Na esquizofrenia, por exemplo, a menor capacidade de interação social se caracteriza no quadro de sintomas negativos, sendo também muito prejudicial a vida social do paciente (MISIAK et al., 2017). Nossos resultados corroboram com o sintoma clínico da mania e o aumento da interação social nos animais tratados com GBR12909. Em termos de prevenção e tratamento, a Mino, fármaco escolhido para investigação no presente trabalho, vem apresentando resultados promissores em estudos clínicos de comportamentos emocionais que requeiram decisão, bem como na correlação com a interação social (WATABE et al., 2012). Nos achados do nosso estudo no teste de interação social, podemos observar a atividade preventiva da Mino25 e Mino50, bem como dos estabilizadores do humor, enquanto na reversão apenas a dose de Mino50 e os estabilizadores de humor apresentaram resultado significativo, o que nos indica uma relação entre os achados e os estudos citados acima, causa esta que pode estar relacionada com a ação antioxidante da Mino e na neuroplasticidade (MONTE et al., 2013), mecanismos que estão comprometidos na fisiopatologia do TAB, o que, portanto, corrobora com nossos resultados (ARIANA et al., 2015). Em trabalho prévio mostramos que a doxiciclina, fármaco também da família das tetraciclina, foi capaz de prevenir as alterações depressão-símile induzidas por LPS (lipopolissacarídeo) (FERREIRA MELLO et al., 2013), o que mostra um potencial efeito estabilizante do humor destas tetraciclina.

### **6.6.4 Minociclina previne alterações induzidas por GBR12909 no teste de plus-maze**

A ansiedade se apresenta em vários transtornos mentais, e também no TAB vem sendo relatada no DSM-V como fator preponderante e persistente nos casos de

transtornos afetivos e de humor, e na mania em termos clínicos sendo acompanhada de períodos de irritação, porém este manual não caracteriza arsenal terapêutico exclusivo nessas condições, principalmente no processo prodrômico deste transtorno (CHAM; KOSLIK; GOLOMB, 2016), o que reforça a necessidade de investigação de novos fármacos. Avaliamos ansiedade através do teste de plus-maze, quanto ao tempo de permanência e o número de entrada nos braços abertos, pois estes dois aspectos condizem com a avaliação dos níveis de ansiedade, pois fundamenta-se na resistência natural de camundongos para áreas abertas e elevadas, bem como sobre seu comportamento natural exploratório espontâneo em ambientes inovadores (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). Nos nossos resultados o GBR12909 aumentou a exploração dos animais nos braços abertos, caracterizando desta forma um aumento no comportamento de risco (YOUNG et al., 2011). A Mino foi capaz de prevenir e reverter estas alterações no teste do labirinto em cruz elevado. Vale destacar que este resultado está em linha com o resultado obtido no teste do odor do gato, onde os animais apresentaram mais exposição ao risco quando administrados GBR12909 sendo que a Mino, principalmente na dose de 50 mg/kg foi capaz de alterar esta resposta. Estes achados mostram que a Mino pode ser uma terapia importante para os estados de mania.

Essa performance conexa ao risco no TAB tem analogia com o aumento nos níveis de dopamina, que tanto está implicado na fisiopatologia da mania bem como na própria ação do GBR12909. Ao observarmos a atividade preventiva da Mino nesse contexto, sugere-se seu papel na regulação deste neurotransmissor no TAB, aspecto a ser analisado em outras investigações.

Dessa forma, nossos estudos indicam a necessidade de mais investigações a respeito da atividade terapêutica potencial da Mino nas alterações de memória, interação social, ansiedade e comportamento de risco presentes no TAB.

#### **6.6.5 Análise da expressão protéica do transportador de dopamina (DAT) nos grupos controle e tratados com Minociclina 50mg e Lítio 47,5mg prevenção e reversão induzidos por GBR 12909**

O domínio regulatório na conservação da homeostase envolvendo a função de dopamina é fornecido pelo transportador de dopamina (DAT), (KLOSOWICZ et al., 2017), que tem a capacidade de remover a DA presente na fenda sináptica e interromper o sinal produzido pelo neurotransmissor. O funcionamento reduzido deste transportador

umenta os níveis de DA na fenda sináptica impedindo seu retorno a célula pré-sináptica, como citado anteriormente, foi associado ao TAB (YOUNG et al., 2011). Não está evidente como os estabilizadores de humor, como o Li age em animais com função de DAT reduzida, embora, em estudos com ratos com expressão normal de DAT, o Li não afetou os níveis de dopamina basal, mas alterou a liberação de dopamina (MILIENNE-PETIOT et al., 2017b). Nossos resultados indicaram expressão proteica do DAT no grupo salina (controle negativo), entretanto o grupo administrado GBR12909 apresentou uma grande redução na expressão desta proteína, o que não foi revertido pelas drogas testadas. Esse resultado pode estar relacionado com o fato do metabolismo da Dopamina e, conseqüentemente, da sensibilidade do DAT a uma variação relacionada ao tempo e a horários, pois estudos já sugerem uma maior flutuação no período diurno na atividade de neurônios dopaminérgicos (FERRIS et al., 2014), o que pode ter influenciado nos resultados expostos, pois os tratamentos com GBR12909 e os demais fármacos eram feitos durante o dia, e o último dia do protocolo e da dissecação das áreas cerebrais também. Outro ponto a ser considerado é o fato do desligamento do DAT do seu inibidor, em que alguns estudos sugerem que isso demore em torno de 24h, e nossos experimentos seguiram o processo de comportamento e dissecação 2h após o último dia de tratamento, fato este que também pode ter influenciado na resposta e expressão proteica do DAT nos animais tratados com GBR12909, Mino e Li, interferindo na possível atividade destes fármacos com a inibição do DAT pelo GBR12909.

Vale salientar, que essa redução do DAT nos animais tratados com os estabilizadores do humor não necessariamente indica a total ausência de regulação nos níveis de dopamina, pois em outros testes avaliados na pesquisa observamos que o prejuízo comportamental, de estresse oxidativo e de neuroplasticidade foram significativamente afetadas pelos estabilizadores do humor e pela Mino em ambas as doses estudadas, sendo parte destes comportamentos dependentes de dopamina.

Entretanto, embora o Li e a Mino não tenham apresentado essa resposta quanto ao DAT, podemos dizer que o resultado corroborou em reforçar o papel do GBR12909 como inibidor do DAT, reforçando estudos anteriores comparando o efeito do GBR12909 ao uso de animais knockout para o DAT como modelos de mania (YOUNG et al., 2010b), porém nestes estudos anteriores não foi avaliada a expressão proteica do DAT, visto que

os protocolos de uma forma geral são baseados em administração única de GBR12909, enquanto que o nosso foi baseado em uma administração repetida.

Dessa forma, sugere-se que o protocolo de comportamento tipo-mania induzido pelo GBR12909 se apresenta de importância equiparada ou superior ao modelo da d-anfetamina proposto previamente (FREY et al., 2006d) e utilizado como padrão ouro para o estudo deste comportamento em roedores.

#### **6.6.6 Análise da expressão protéica do IBA1 nos grupos controle e tratados com Minociclina 50mg e Lítio 47,5mg prevenção e reversão induzidos por GBR 12909**

A neuroinflamação estuda alterações imunes do sistema nervoso central (SNC), tendo nítida e confirmada participação na fisiopatologia de transtornos mentais. A microglia, célula imune inata residente no SNC, atua como mediador celular essencial do processo de neuroinflamação. Ela quando ativada produz citocinas e quimiocinas que influenciam na plasticidade sináptica, no metabolismo de neurotransmissores e neurocircuitos que atuam na regulação do humor (ISGREN et al., 2017).

Diversas pesquisas já indicam a ligação da neuroinflamação na fisiopatologia do TAB, com comprometimento de mecanismos de neuroplasticidade, sobrevivência neuronal, parâmetros que são diretamente influenciados pela atividade de neurotransmissores, hormônios e neurotrofinas; e que desregulados podem promover instabilidade no processo de homeostase, atuando como pró-inflamatórios, e assim influenciando na gênese do TAB. Isso é comprovado através de pesquisas atuais que vem evidenciando o aumento de achados de citocinas inflamatórias em diferentes fases do TAB, agindo desde a ativação de neutrófilos, aumento da permeabilidade celular e síntese de proteínas de fase aguda do processo inflamatório. Relacionando assim o papel do sistema imune inato como diretamente associado ao TAB, bem como de fatores neurotróficos, especialmente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), estresse oxidativo, além de citocinas e quimiocinas (SAYANA et al., 2017), todos em conjunto promovendo um processo de desregulação inflamatória no SNC, e causando assim, progressão do transtorno e indicando a necessidade de novos fármacos que atuem neste alvo que se apresenta como de grande relevância na fisiopatologia do TAB.

Nossos resultados indicaram que a administração repetida de GBR12909 é capaz de aumentar a expressão proteica de IBA1, uma proteína de ligação ao cálcio específica

para microglia / macrófagos (OHSAWA et al., 2004), e que o Li e Mino foram capazes de prevenir esta alteração. Este achado corrobora com o efeito anti-inflamatório da Mino (ROSENBLAT; MCINTYRE, 2016), sugerindo, portanto que o efeito de estabilização da microglia pela Mino é importante para seu efeito antimaníaco.

Escolhemos avaliar a atividade inflamatória através da micróglia através da técnica de imunoblotting na área do hipocampo visando um resultado seguro e robusto, já que microglia e astrócitos são os maiores tipos de células gliais envolvidas na regulação do processo imunológico de processos patológicos cerebrais (CHEN et al., 2015), estando também envolvidos na produção e liberação de citocinas inflamatórias, produção de espécies reativas de oxigênio e consequentemente na lesão neuronal (CHEN et al., 2015), sendo assim parâmetro norteador do processo inflamatório no modelo animal estudado e no tratamento.

Relacionando o envolvimento do processo inflamatório com outras vias avaliadas na pesquisa como o estresse oxidativo, observamos que, de fato, a Mino conseguiu prevenir e reverter as alterações na peroxidação lipídica no hipocampo induzidos pelo tratamento repetido com GBR12909, corroborando com o achado de prevenção na avaliação do marcador IBA1, sendo um indicador que nesta área cerebral a Mino consegue expressar sua ação anti-inflamatória corroborando com o estudo em que demonstra seu papel neuroprotetor através da regulação da expressão de IBA1 em injúria cerebral neonatal induzida por hipóxia (MIN et al., 2017).

Logo, nosso estudo acredita contribuir com a demonstração que a Mino possa vir a ser mais investigada e assim colaborar quanto ao seu papel anti-inflamatório na fisiopatologia do TAB.



## 7.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O TAB vem sendo considerado como uma das dez doenças mais incapacitantes do mundo, o que o sinaliza como um alvo necessário e urgente de pesquisas na área de neurociências e psiquiatria translacional. Indica conceber que uma grande parcela da população de médicos e pacientes necessitam desse investimento intelectual e do retorno científico com resposta através da sinalização de novas substâncias efetivas através de modelos animais que mimetizem o transtorno.

Nossa pesquisa se propôs a contribuir com a pesquisa para o TAB através da investigação de um novo modelo de mania induzido pela administração repetida de GBR12909 e do efeito potencial da Mino, um fármaco já utilizado na clínica como antimicrobiano, e que vem apresentando efeitos neuroprotetores. Buscamos adaptar o modelo de mania com o uso repetido do GBR12909 para a realização de protocolos de prevenção e reversão semelhantes ao modelo de mania induzido por d-anfetamina (FREY et al., 2006c), (KAPCZINSKI et al., 2008a), padrão ouro para o estudo da mania.

A proposta inicial do trabalho foi verificar o curso temporal das alterações induzidas pela administração única do GBR12909. Neste protocolo observamos o comportamento de hiperlocomoção em grupos distintos nos períodos de tempo de 2, 4, 8, 12 e 24h após administração do GBR12909, e que encontramos melhor resultado nos pontos de tempo de 2 e 24h, o que nos norteou a adaptação do modelo. Além disso, observamos a atividade dos estabilizadores do humor Li e Val na prevenção de animais tratados durante 3 dias com estes fármacos e posterior tratamento com GBR12909, reforçando os próximos passos da pesquisa em que continuamos utilizando Li e Val como grupos controle positivo com a finalidade de comparação para avaliar a atividade da Mino no modelo, onde os resultados estão ilustrados no esquema do Quadro 3.

Posteriormente, seguimos o protocolo de prevenção e reversão através da administração repetida de GBR12909 com avaliação da hiperlocomoção através do teste do campo aberto, do comportamento de risco através do teste do odor do gato e do estresse oxidativo através dos testes de GSH e TBARs, em que a Mino apresentou resultados significativos quando comparado aos estabilizadores do humor, reforçando seu possível papel como fármaco antimaníaco, conforme demonstramos os resultados encontrados no

esquema do Quadro 4. Vale destacar que os poucos grupos de pesquisa que trabalham com GBR12909 como modelo de mania normalmente o fazem com administração única.

Na terceira etapa seguimos com o protocolo de prevenção e reversão onde avaliamos os comportamentos relacionados a memória, interação social e ansiedade, bem como a expressão proteica dos marcadores DAT e IBA através do imunoblotting, em que buscamos avaliar o alvo do GBR12909, o DAT, e o papel da Mino como anti-inflamatório com o marcador de micróglia, Iba1. Esses resultados demonstraram um papel significativo de prevenção da Mino nas alterações comportamentais induzidas por GBR12909. Observamos neste protocolo, que o GBR12909 causou déficits na memória de trabalho e comportamento de redução da ansiedade/aumento do comportamento de risco, enquanto que a Mino foi capaz de prevenir e reverter parcialmente estas alterações. Vimos também que a Mino apresentou efeito anti-inflamatório reduzindo a expressão de IBA1 e que a grande redução do DAT induzida pelo GBR12909 não foi revertida por nenhuma das drogas testadas. Esses resultados estão demonstrados no esquema do Quadro 5.








Como perspectivas de continuidade do estudo destacamos a análise da GSK3 $\beta$ , citocinas e a avaliação da atividade mitocondrial, parâmetros de suma importância na fisiopatologia do TAB. Como limitação do estudo temos o tempo de 2 h para avaliação do DAT, o que pode ter interferido nos resultados obtidos. Seguimos esse tempo de 2 h baseado nas pesquisas de modelos animais de mania que seguem esse protocolo. Entretanto, para o GBR12909 acreditamos que seria interessante utilizar outra variação maior de tempo para expressar de forma mais expressiva o marcador DAT.

Outro ponto a ser analisado em próximos estudos está em avaliar o efeito de outros fármacos no modelo de mania induzido por GBR1209, além dos fármacos padrão Li e Val e da própria Mino. É interessante pensar em um fármaco que possa atuar antagonizando o efeito molecular de inibidor do DAT e que assim opere na ação inicial do GBR12909.







Assim, confiamos, a partir dos dados achados, que a pesquisa teve delineamento e saldos positivos que sinalizam como subsídios para posteriores investigações e assim cooperando com a literatura científica acerca deste transtorno tão preocupante para a saúde pública mundial.








Quadro 3 – Resumo dos resultados encontrados no Protocolo 1









Administração única de GBR12909 10mg /kg ou Sal (ip)		
<b>Na Avaliação da Atividade Locomotora</b>	apresentaram melhor resposta 	Grupos de 2h e 24h após a administração
<b>Glutathiona Reduzida</b>	Córtex Pré-Frontal 	GSH diminuiu no tempo de 8,12 e 24h
	Estriado 	GSH diminuiu no tempo de 2,4,8 e 12h
	Hipocampo 	GSH diminuiu em todos os pontos de tempo avaliados
<b>Níveis de MDA</b>	Córtex Pré-Frontal 	MDA aumentou no tempo de 2 e 12h
	Estriado 	MDA aumentou no tempo de 2 e 12h
	Hipocampo 	MDA aumentou no tempo de 2 e 12h

Quadro 4 – Resumo dos resultados encontrados no Protocolo 2

Administração repetida de GBR12909 10mg /kg ou Sal (ip)		
<b>Na Avaliação da Atividade Locomotora</b>	Mino doses de 25 e 50 mg /kg 	Minociclina previne e reverte hiperlocomoção e comportamento exploratório
<b>Teste do Odor do Gato</b>	Mino doses de 25 e 50 mg /kg 	Minociclina previne e reverte o aumento do comportamento de risco induzido
<b>Glutathiona Reduzida</b>	<p>Córtex Pré-Frontal</p> 	<p><b>Prevenção</b> - Redução nos níveis de GSH nos grupos Sal + GBR12909, Li + GBR12909, VAL + GBR12909, Mino25 + GBR12909 ou Mino50 + GBR12909</p> <p><b>Reversão</b> - GBR12909 + VAL ou GBR12909 + Mino50 diminuição dos níveis de GSH em relação ao grupo controle, GBR12909 + Mino25 aumentou os níveis de GSH quando comparado ao grupo GBR12909 + Sal</p>
	<p>Estriado</p> 	<p><b>Prevenção</b> - os tratamentos testados (Li, VAL, Mino25 ou Mino50) mantiveram a diminuição dos níveis de GSH</p> <p><b>Reversão</b> - todas as drogas testadas reverteram a diminuição do teor de GSH</p>
	<p>Hipocampo</p> 	<p><b>Prevenção</b> - Nenhum dos medicamentos testados (Li, VAL, Mino25 ou Mino50) impediu as alterações nos níveis de GSH</p> <p><b>Reversão</b> - O tratamento com Mino 25 ou Mino 50 reverteu a redução nos níveis de GSH</p>
	<p>Vermis cerebelar</p> 	Não houve diferença significativa no conteúdo do GSH observado no protocolo de prevenção ou reversão

<b>NÍVEIS DE MDA</b>	Córtex Pré-Frontal 	<b>Prevenção</b> - Foi prevenida pela administração de Li ou VAL, enquanto o pré-tratamento com Mino25 ou 50 aumentou esse parâmetro em relação ao controle e animais tratados com GBR12909
		<b>Reversão</b> - Peroxidação lipídica aumentou em animais tratados com GBR12909, e o tratamento com VAL ou Mino25 também demonstrou aumento quando comparado ao animais controle tratados com GBR12909
	Estriado 	MDA aumentou no tempo de 2 e 12h
	Vermis cerebelar 	<b>Prevenção</b> - Aumento da peroxidação lipídica nos grupos VAL + GBR12909, Mino25 + GBR12909 ou Mino50 + GBR12909
	<b>Reversão</b> - Aumento da peroxidação lipídica nos grupos GBR12909 + Li , GBR12909 + VAL, GBR12909 + Mino25, GBR12909 + Mino50	
	Hipocampo 	<b>Prevenção</b> - Grupo Mino25 apresentou redução da peroxidação lipídica em relação ao grupo GBR12909 + Sal
		<b>Reversão</b> - Não houve resultado significativo
<b>BDNF</b>	Hipocampo 	A minociclina reverteu a diminuição dos níveis de BDNF do hipocampo

Quadro 5 – Resumo dos resultados encontrados no Protocolo 3

Administração repetida de GBR12909 10mg /kg ou Sal (ip)		
<b>Teste de Interação Social</b>	Mino doses de 25 e 50 mg /kg 	Mino preveniu e reverteu as alterações causadas pelo GBR 12909
<b>Teste de Y-maze</b>	Mino doses de 25 e 50 mg /kg 	Minociclina preveniu as alterações espontâneas de animais tratados com GBR 12909
<b>Teste do labirinto em cruz elevado (NEBA)</b>	Mino doses de 25 e 50 mg /kg 	Nos protocolos de prevenção e reversão os grupos tratados com Li, Val, Mino25 e Mino50 conseguiram diminuir o NEBA quando comparados ao grupo GBR12909
<b>Teste do labirinto em cruz elevado (TPBA)</b>	Mino doses de 25 e 50 mg /kg 	Mino conseguiu prevenir e reverter o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado
<b>Expressão da proteína DAT</b>	Mino 50 mg /kg  Hipocampo 	O tratamento repetido com GBR12909 causou uma redução significativa na expressão proteica do DAT em relação aos animais tratados com salina. Mino 50 e Li não conseguiram prevenir nem reverter a redução do DAT causada por GBR12909.
<b>Expressão da proteína IBA1</b>	Mino 50 mg /kg  Hipocampo 	O tratamento repetido com GBR12909 causou aumento significativo na expressão do Iba1. O tratamento preventivo com Mino causou uma redução significativa deste parâmetro em relação ao grupo GBR12909.

## 8.0. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo apontam para o período de tempo de 2 h pós-GBR12909 (em administração única) como o mais evidente para a avaliação de alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas ao fenótipo de mania. Outra observação importante foi que Li, bem como VAL foram eficazes na prevenção das alterações comportamentais induzidas por este inibidor de DAT. Em geral, nossos resultados contribuem para a validade de constructo (pela determinação de desequilíbrio oxidativo), bem como para a validade preditiva do modelo de mania induzido por GBR12909 (pela determinação de efeitos preventivos do Li e Val). Aqui também estendemos a validade do modelo animal de mania induzido pela administração repetida de GBR12909, mostrando a manifestação de alterações pró-oxidante, neuroinflamatórias, e redução da expressão proteica de DAT, bem como a capacidade das drogas estabilizadoras do humor, Li e VAL, na prevenção e reversão dessas alterações. Trazemos conclusões iniciais em relação à prevenção e reversão de alterações mania-símile induzidas pelo GBR12909 com a Minociclina. O efeito preventivo foi relacionado a alterações antioxidantes em áreas cerebrais como hipocampo e estriado, enquanto alterações neurotróficas foram observadas no efeito de reversão. A minociclina também preveniu alterações neuroinflamatórias induzidas por GBR12909, o que não foi visto com o Li. Assim, nossos resultados dão a primeira evidência pré-clínica sobre o potencial antimania, bem como do possível efeito enquanto estabilizador da minociclina. Este estudo abre perspectivas para a concepção de ensaios clínicos de prova de conceito do uso da minociclina (sozinha ou como um tratamento adjuvante) para mania.



## BIBLIOGRAFIA

AHMAD, A. et al. Endoxifen, a New Treatment Option for Mania: A Double-Blind, Active-Controlled Trial Demonstrates the Antimanic Efficacy of Endoxifen. **Clinical and Translational Science**, v. 9, n. 5, p. 252–259, 2016.

AMANN, B. L. et al. Psychiatric and physical comorbidities and their impact on the course of bipolar disorder: A prospective, naturalistic 4-year follow-up study. **Bipolar Disorders**, v. 19, n. 3, p. 225–234, 2017.

ANAND, A. et al. Striatal dopamine transporter availability in unmedicated bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, 2011.

ANDERSEN, P. H.; JANSEN, J. A.; NIELSEN, E. B. [3H]GBR 12935 binding in vivo in mouse brain: labelling of a piperazine acceptor site. **European Journal of Pharmacology**, 1987.

ARAKAWA, S. et al. Minocycline produced antidepressant-like effects on the learned helplessness rats with alterations in levels of monoamine in the amygdala and no changes in BDNF levels in the hippocampus at baseline. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 3, p. 601–606, 2012.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.

ARIANA, J. et al. Antimanic-like activity of candesartan in mice : Possible involvement of antioxidant , anti-inflammatory and neurotrophic mechanisms. **European Neuropsychopharmacology**, p. 1–12, 2015.

ASSOCIATION, A. P. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. **Psychiatric News**, v. 51, n. 9, p. 1–1, 2016.

BARR, A. M. et al. The Selective Serotonin-2A Receptor Antagonist M100907 Reverses Behavioral Deficits in Dopamine Transporter Knockout Mice. **Neuropsychopharmacology**, 2004.

BEAULIEU, J.-M. et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5099–104, 2004.

BENARD, V. et al. Lithium and suicide prevention in bipolar disorder. **L'Encéphale**, v. 42, n. 3, p. 234–241, jun. 2016.

BERK, M. et al. Dopamine dysregulation syndrome: Implications for a dopamine

- hypothesis of bipolar disorder. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, 2007.
- BERK, M. et al. **From neuroprogression to neuroprotection: Implications for clinical care** **Medical Journal of Australia**, 2010.
- BERK, M. et al. **Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2011.
- BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 148, p. 114–131, 2015.
- BLACKER, C. J. et al. **Metabotropic glutamate receptors as emerging research targets in bipolar disorder** **Psychiatry Research**, 2017.
- BLANCO, C. et al. Epidemiology of DSM-5 bipolar I disorder: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions – III. **Journal of Psychiatric Research**, v. 84, p. 310–317, 2017.
- BOSAIPO, N. B.; JURUENA, M. F. Suplemento Temático : Psiquiatria I Transtorno bipolar : uma revisão dos aspectos conceituais e clínicos. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 50, p. 72–84, 2017.
- BOWEN, M. T. et al. Defensive Aggregation (Huddling) in *Rattus Norvegicus* toward Predator Odor: Individual Differences, Social Buffering Effects and Neural Correlates. **PLoS ONE**, 2013.
- BROGI, S. et al. First dual AK/GSK-3 $\beta$  inhibitors endowed with antioxidant properties as multifunctional, potential neuroprotective agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.
- CALABRESE, J. R. et al. A 20-month, double-blind, maintenance trial of lithium versus divalproex in rapid-cycling bipolar disorder. **American Journal of Psychiatry**, 2005.
- CAPPELIEZ, P.; MOORE, E. Effects of lithium on an amphetamine animal model of bipolar disorder. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, 1990.
- CHAM, S.; KOSLIK, H. J.; GOLOMB, B. A. Mood, Personality, and Behavior Changes During Treatment with Statins: A Case Series. **Drug Safety - Case Reports**, v. 3, n. 1, p. 1, 2016.
- CHEN, H. et al. Protective effects of the antioxidant sulforaphane on behavioral changes and neurotoxicity in mice after the administration of methamphetamine.

**Psychopharmacology**, 2012.

CHEN, H.; UZ, T.; MANEV, H. Minocycline affects cocaine sensitization in mice. **Neuroscience Letters**, v. 452, n. 3, p. 258–261, 2009.

CHEN, L.-W. et al. Microglia and astroglia: the role of neuroinflammation in lead toxicity and neuronal injury in the brain. **Neuroimmunology and Neuroinflammation**, 2015.

CHEN, S. et al. Valproic Acid: A New Candidate of Therapeutic Application for the Acute Central Nervous System Injuries. **Neurochemical Research**, p. 1–13, 31 jan. 2014.

CHENIAUX, E. **O tratamento farmacológico do transtorno bipolar: Uma revisão sistemática e crítica dos aspectos metodológicos dos estudos clínicos modernos** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2011.

CIPRIANI, A. et al. Comparative efficacy and acceptability of antimanic drugs in acute mania: A multiple-treatments meta-analysis. **The Lancet**, 2011.

CIPRIANI, A. et al. Lithium in the prevention of suicide in mood disorders: updated systematic review and meta-analysis. **Bmj**, 2013.

ÇUHADAR, D. et al. Family Functionality and Coping Attitudes of Patients with Bipolar Disorder. **Journal of Religion and Health**, 2015.

CUI, J. et al. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. **Neuroscience**, 2007.

DA-ROSA, D. D. et al. Effects of lithium and valproate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of m-AMPH. **Psychiatry Research**, 2012.

DALL'IGNA, O. P. et al.  $\beta$ -Amyloid treatment sensitizes mice to amphetamine-induced locomotion but reduces response to caffeine. **Neurodegenerative Diseases**, v. 1, n. 1, p. 38–43, 2004.

DE QUEIROZ, A. I. G. et al. Antimanic activity of minocycline in a GBR12909-induced model of mania in mice: Possible role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Journal of Affective Disorders**, 2018.

DE SOUSA, R. T. et al. Lithium increases platelet serine-9 phosphorylated GSK-3 $\beta$  levels in drug-free bipolar disorder during depressive episodes. **Journal of Psychiatric Research**, v. 62, p. 78–83, 2015.

DEAN, O. M. et al. Minocycline: Therapeutic potential in psychiatry. **CNS Drugs**, 2012a.

DEAN, O. M. et al. Minocycline. **CNS Drugs**, 2012b.

DEAN, O. M. et al. Adjunctive minocycline treatment for major depressive disorder : A

proof of concept trial. 2017.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive Behavior in Rats Toward Predatory Odors.pdf. v. 25, n. 2001, p. 597–609, 2001a.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2001b.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 7, p. 1175–86, 2003.

DREVETS, W.; PRICE, J.; FUREY, M. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Structure and Function**, 2008.

EGER, G. A. et al. Antioxidant effect of simvastatin through oxidative imbalance caused by lisdexamfetamine dimesylate. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 2016.

EL-SHIMY, I. A.; HEIKAL, O. A.; HAMDY, N. Minocycline attenuates A $\beta$  oligomers-induced pro-inflammatory phenotype in primary microglia while enhancing A $\beta$  fibrils phagocytosis. **Neuroscience Letters**, 2015.

ENKHUIZEN, J. VAN et al. Reduced Dopamine Transporter Functioning Induces High-Reward Risk-Preference Consistent with Bipolar Disorder. v. 39, n. 13, p. 3112–3122, 2014.

ENKHUIZEN, J. VAN et al. Bipolar Disorder Revisited. p. 114–126, 2016.

ESALATMANESH, S. et al. Minocycline combination therapy with fluvoxamine in moderate-to-severe obsessive-compulsive disorder: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 70, n. 11, p. 517–526, 2016.

EVENDEN, J. Impulsivity: a discussion of clinical and experimental findings. **Journal of Psychopharmacology**, 1999.

FERNANDES, B. S. et al. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: A systematic review and meta-regression analysis. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, n. 8, p. 995–1004, 2011.

FERREIRA MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1521–1529, 2013.

FERRIS, M. J. et al. Dopamine transporters govern diurnal variation in extracellular dopamine tone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 26, p.

E2751–E2759, 2014.

FLAISHER-GRINBERG, S.; EINAT, H. Strain-specific battery of tests for domains of mania: Effects of valproate, lithium and imipramine. **Frontiers in Psychiatry**, 2010.

FRASER, C. M. et al. Interactions between ifenprodil and dizocilpine on mouse behaviour in models of anxiety and working memory. **European Neuropsychopharmacology**, v. 6, n. 4, p. 311–316, 1996.

FREEMAN, M. P.; STOLL, A. L. **Mood stabilizer combinations: A review of safety and efficacy** *American Journal of Psychiatry*, 1998.

FREY, B. N. et al. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: Possible relevance as a model of mania. **Bipolar Disorders**, 2006a.

FREY, B. N. et al. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. **Behavioural Pharmacology**, 2006b.

FREY, B. N. et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sciences**, v. 79, n. 3, p. 281–286, 2006c.

FREY, B. N. et al. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. **Behav Pharmacol**, 2006d.

FREY, B. N. et al. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 283–5, 2007.

FREY, B. N. et al. Biomarkers in bipolar disorder: A positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, 2013a.

FREY, B. N. et al. Biomarkers in bipolar disorder: a positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 321–32, abr. 2013b.

FRIES, G. R. et al. Memory and brain-derived neurotrophic factor after subchronic or chronic amphetamine treatment in an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, 2015.

FUJITA, Y. et al. The antibiotic minocycline prevents methamphetamine-induced rewarding effects in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2012.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J. et al. Factores asociados a la polaridad predominante en el trastorno bipolar: una revisión sistemática. **Revista de Psiquiatría y Salud Mental**, n. xx, 2017.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. **Minocycline: Far beyond an antibiotic***British Journal of Pharmacology*, 2013.

GEDDES, J. R.; MIKLOWITZ, D. J. Treatment of bipolar disorder. *Lancet*, v. 381, n. 9878, p. 1672–82, 2013.

GIDEONS, E. S. et al. Chronic lithium treatment elicits its antimanic effects via BDNF-TRKB dependent synaptic downscaling. *eLife*, v. 6, p. 1–21, 2017.

GREENWOOD, T. A. et al. Identification of additional variants within the human dopamine transporter gene provides further evidence for an association with bipolar disorder in two independent samples. *Molecular psychiatry*, 2006.

HALCOMB, M. E.; GOULD, T. D.; GRAHAME, N. J. Lithium, but not Valproate, Reduces Impulsive Choice in the Delay-Discounting Task in Mice. *Neuropsychopharmacology*, 2013.

HOLLANDER, E. et al. Divalproex in the Treatment of Impulsive Aggression: Efficacy in Cluster B Personality Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 2003.

HOPKINS, H. S.; GELENBERG, A. J. Serum lithium levels and the outcome of maintenance therapy of bipolar disorder. *Bipolar disorders*, 2000.

HORSCHITZ, S. et al. A dopamine transporter mutation associated with bipolar affective disorder causes inhibition of transporter cell surface expression. *Molecular psychiatry*, v. 10, p. 1104–1109, 2005.

HUSAIN, M. I. et al. Minocycline as an adjunct for treatment-resistant depressive symptoms: study protocol for a pilot randomised controlled trial. *Trials*, 2015.

HUSAIN, M. I. et al. Minocycline and celecoxib as adjunctive treatments for bipolar depression: A study protocol for a multicenter factorial design randomized controlled trial. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2017.

ISGREN, A. et al. Markers of neuroinflammation and neuronal injury in bipolar disorder: Relation to prospective clinical outcomes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2017.

IZCI, F. et al. The differences in temperament–character traits, suicide attempts, impulsivity, and functionality levels of patients with bipolar disorder I and II. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2016.

J., V. E. et al. Differential effects of dopamine transporter inhibitors in the rodent Iowa gambling task. *Psychopharmacology*, 2013.

JORNADA, L. K. et al. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *Journal of Psychiatric*

**Research**, 2011.

KAPCZINSKI, F. et al. **Allostatic load in bipolar disorder: Implications for pathophysiology and treatment** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2008a.

KAPCZINSKI, F. et al. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, n. 3, p. 243–245, 2008b.

KEMP, D. E. et al. A 6-month, double-blind, maintenance trial of lithium monotherapy versus the combination of lithium and divalproex for rapid-cycling bipolar disorder and co-occurring substance abuse or dependence. **Journal of Clinical Psychiatry**, 2009.

KETTER, T. A. et al. Treatment of bipolar disorder: Review of evidence regarding quetiapine and lithium. **Journal of Affective Disorders**, v. 191, p. 256–273, 2016.

KHAN, A. et al. ADOLESCENT GBR12909 EXPOSURE INDUCES OXIDATIVE STRESS, DISRUPTS PARVALBUMIN-POSITIVE INTERNEURONS, AND LEADS TO HYPERACTIVITY AND IMPULSIVITY IN ADULT MICE. **Neuroscience**, v. 345, p. 166–175, 2017.

KIM, H. S.; SUH, Y. H. **Minocycline and neurodegenerative diseases** *Behavioural Brain Research*, 2009.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 3, p. 417–22, 1 set. 2011.

KLOSOWICZ, A. C. et al. Potential role of dopamine transporter in behavioral flexibility. p. 176–189, 2017.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated Plus Maze for Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 22, p. 1–4, 2008.

KRAUS, R. L. et al. Antioxidant properties of minocycline: Neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. **Journal of Neurochemistry**, 2005.

KULOGLU, M. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Cell Biochemistry and Function**, 2002a.

KULOGLU, M. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Cell Biochem.Funct.**, 2002b.

KUMAR, A.; CHAUDHARY, T.; MISHRA, J. Minocycline modulates neuroprotective effect of hesperidin against quinolinic acid induced Huntington's disease like symptoms in rats: Behavioral, biochemical, cellular and histological evidences. **European Journal**

**of Pharmacology**, 2013.

KUNZ, M. et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2008.

LACERDA, A. E. et al. Vanoxerine: Cellular mechanism of a new antiarrhythmic. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, 2010.

LEVKOVITZ, Y. et al. Minocycline, a second-generation tetracycline, as a neuroprotective agent in an animal model of schizophrenia. **Brain Research**, 2007.

LOGAN, R. W.; MCCLUNG, C. A. **Animal models of bipolar mania: The past, present and future** *Neuroscience*, 2016.

LOPES-BORGES, J. et al. Histone deacetylase inhibitors reverse manic-like behaviors and protect the rat brain from energetic metabolic alterations induced by ouabain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 128, p. 89–95, 2014.

MACÊDO, D. S. et al. Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by d-amphetamine. **Bipolar Disorders**, 2012.

MACÊDO, D. S. et al. Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate: Relevance as an animal model of mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2013.

MAGALHÃES, P. V. S.; FRIES, G. R.; KAPCZINSKI, F. Marcadores periféricos e a fisiopatologia do transtorno bipolar. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 39, n. 2, p. 60–67, 2012.

MANDUCA, A. et al. Dopaminergic Neurotransmission in the Nucleus Accumbens Modulates Social Play Behavior in Rats. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, 2016.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med**, 2001.

MARTINO, D. J. et al. Longitudinal relationship between clinical course and neurocognitive impairments in bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 225, p. 250–255, 2017.

MEISER, J.; WEINDL, D.; HILLER, K. Complexity of dopamine metabolism. **Cell communication and signaling : CCS**, 2013.

MILIENNE-PETIOT, M. et al. Neuropharmacology The effects of reduced dopamine transporter function and chronic lithium on motivation , probabilistic learning , and



neurochemistry in mice : Modeling bipolar mania. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 260–270, 2017a.

MILIENNE-PETIOT, M. et al. The effects of reduced dopamine transporter function and chronic lithium on motivation, probabilistic learning, and neurochemistry in mice: Modeling bipolar mania. **Neuropharmacology**, 2017b.

MIN, Y. et al. Minocycline-Suppression of Early Peripheral Inflammation Reduces Hypoxia-Induced Neonatal Brain Injury. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. September, p. 1–14, 2017.

MINICHINO, A. et al. The role of cerebellum in unipolar and bipolar depression: a review of the main neurobiological findings. **Riv Psichiatr**, 2014.

MISIAK, B. et al. Interactions Between Variation in Candidate Genes and Environmental Factors in the Etiology of Schizophrenia and Bipolar Disorder: a Systematic Review. **Molecular Neurobiology**, 2017.

MIYAOKA, T. et al. Possible antipsychotic effects of minocycline in patients with schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2007.

MIYAOKA, T. et al. Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: An open-label study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2012.

MONTE, A. S. et al. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 11, p. 1032–43, nov. 2013.

MORENO, R. A. et al. Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. SUPPL. 3, p. 37–43, 2004.

MORETTI, M. et al. Behavioral and neurochemical effects of sodium butyrate in an animal model of mania. **Behavioural Pharmacology**, 2011.

MORIMOTO, N. et al. Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. **Brain Research**, 2005.

MUNEER, A. Mixed States in Bipolar Disorder: Etiology, Pathogenesis and Treatment. **Chonnam medical journal**, 2017.

NADERI, Y. et al. Neuroprotective effects of pretreatment with minocycline on memory impairment following cerebral ischemia in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, p.

214–222, 2017.

NALIVAEVA, N. N. et al. Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2012.

NASCIMENTO, C. et al. Glutathione-mediated effects of lithium in decreasing protein oxidation induced by mitochondrial complex I dysfunction. **Journal of Neural Transmission**, 2015.

NAUTIYAL, K. M. et al. Genetic and Modeling Approaches Reveal Distinct Components of Impulsive Behavior. **Nature Publishing Group**, 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, jun. 1979.

OHMURA, Y. et al. Lithium, but not valproic acid or carbamazepine, suppresses impulsive-like action in rats. **Psychopharmacology**, 2012.

OHSAWA, K. et al. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. **Journal of Neurochemistry**, 2004.

OLIVEIRA, G. B. et al. Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. **Brain research**, 2014.

OWEN, R. et al. The reciprocal relationship between bipolar disorder and social interaction: A qualitative investigation . **Clinical Psychology & Psychotherapy** , 2016.

PAIVA, F. P. DE; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. **Fiocruz**, p. 28 p., 2005.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PINSONNEAULT, J. K. et al. Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, 2011a.

PINSONNEAULT, J. K. et al. Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, 2011b.

QUEIROZ, A. I. G. et al. GBR 12909 administration as an animal model of bipolar mania: time course of behavioral, brain oxidative alterations and effect of mood stabilizing drugs. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 5, 2015.

QUINTERO, E. M. et al. Behavioral and morphological effects of minocycline in the 6-

- hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**, 2006.
- QUIROZ, J. A. et al. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 11, p. 2551–2565, 2008.
- RADYUSHKIN, K.; HAMMERSCHMIDT, K. Neuroligin-3-deficient mice : model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. p. 416–425, 2009.
- RAFFA, M. et al. Reduced antioxidant defense systems in schizophrenia and bipolar I disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2012.
- RALPH-WILLIAMS, R. J. et al. Valproate attenuates hyperactive and perseverative behaviors in mutant mice with a dysregulated dopamine system. **Biological Psychiatry**, 2003.
- RAO, J. S. et al. Chronic NMDA administration to rats up-regulates frontal cortex cytosolic phospholipase A2 and its transcription factor, activator protein-2. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1918–1927, 2007.
- RÉUS, G. Z. et al. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. **Metabolic Brain Disease**, 2015.
- ROSENBLAT, J. D.; MCINTYRE, R. S. **Bipolar Disorder and Inflammation** *Psychiatric Clinics of North America*, 2016.
- RUSH, C. R. et al. Reinforcing and subject-rated effects of methylphenidate and d-amphetamine in non-drug-abusing humans. **Journal of clinical psychopharmacology**, 2001.
- SAITO, S. et al. Cognitive function, treatment response to lithium, and social functioning in Japanese patients with bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, n. December 2016, p. 1–11, 2017.
- SAVITZ, J. et al. Minocycline and aspirin in the treatment of bipolar depression: a protocol for a proof-of-concept, randomised, double-blind, placebo-controlled, 2x2 clinical trial. **BMJ open**, v. 2, n. 1, p. e000643, jan. 2012.
- SAYANA, P. et al. A systematic review of evidence for the role of inflammatory biomarkers in bipolar patients. **Journal of Psychiatric Research**, 2017.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

- SELEK, S. et al. Oxidative markers of myeloperoxidase and catalase and their diagnostic performance in bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, 2015.
- SMITH, L. A. LA et al. Effectiveness of mood stabilizers and antipsychotics in the maintenance phase of bipolar disorder : a systematic review of randomized controlled trials. **Bipolar Disorders**, 2007.
- SMITTKAMP, S. et al. Differential effects of amphetamine and GBR-12909 on orolingual motor function in young vs aged F344/BN rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 24, p. 4695–4701, 2014.
- STANFORD, M. S. et al. A comparison of anticonvulsants in the treatment of impulsive aggression. **Experimental and clinical psychopharmacology**, 2005.
- STONE, W. S. et al. Scopolamine- and morphine-induced impairments of spontaneous alternation performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. **Behavioral neuroscience**, v. 105, n. 2, p. 264–71, 1991.
- SWANN, A. C. et al. Increased impulsivity associated with severity of suicide attempt history in patients with bipolar disorder. **American Journal of Psychiatry**, 2005.
- SWANN, A. C. et al. Increased trait-like impulsivity and course of illness in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, 2009.
- TOWBIN, J. A. Introduction to the techniques of molecular biology. **Herz**, 1993.
- TSAI, M. C.; HUANG, T. L. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a state biomarker of oxidative stress in bipolar patients in a manic phase. **Journal of Affective Disorders**, 2015.
- TSALTAS, E. et al. Enhancing effects of chronic lithium on memory in the rat. **Behavioural Brain Research**, 2007.
- TUNNEL, ZGÜR KORHAN et al. Oxidative stress in bipolar and schizophrenia patients. **Psychiatry Research**, 2015.
- VALVASSORI, S. S. et al. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2008.
- VALVASSORI, S. S. et al. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 14, p. 903–909, 2010.
- VALVASSORI, S. S. et al. Effects of mood stabilizers on oxidative stress-induced cell death signaling pathways in the brains of rats subjected to the ouabain-induced animal

model of mania. Mood stabilizers exert protective effects against ouabain-induced activation of the cell de. **Journal of Psychiatric Research**, v. 65, p. 63–70, 2015.

VALVASSORI, S. S. et al. Lithium and valproate act on GSK-3 $\beta$  signaling pathway to reverse the manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. **Neuropharmacology**, v. 117, 2016.

VALVASSORI, S. S. et al. Lithium and valproate act on the GSK-3 $\beta$  signaling pathway to reverse manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. **Neuropharmacology**, 2017.

VAN ENKHUIZEN, J. et al. Chronic valproate attenuates some, but not all, facets of mania-like behaviour in mice. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, 2013.

VIETA, E.; SANCHEZ-MORENO, J. Acute and long-term treatment of mania. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 165–179, 2008.

WATABE, M. et al. Does minocycline, an antibiotic with inhibitory effects on microglial activation, sharpen a sense of trust in social interaction? **Psychopharmacology**, 2012.

YAMATO, M. et al. Determination of reactive oxygen species associated with the degeneration of dopaminergic neurons during dopamine metabolism. **Free Radic Res**, 2010.

YILDIZ, A. et al. A network meta-analysis on comparative efficacy and all-cause discontinuation of antimanic treatments in acute bipolar mania. **Psychological Medicine**, 2015.

YOUNG, J. W. et al. GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: Mimicking quantitative assessment of manic behavior. **Psychopharmacology**, 2010a.


YOUNG, J. W. et al. GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: Mimicking quantitative assessment of manic behavior. **Psychopharmacology**, v. 208, n. 3, p. 443–454, fev. 2010b.

YOUNG, J. W. et al. Increased risk-taking behavior in dopamine transporter knockdown mice: further support for a mouse model of mania. **Journal of Psychopharmacology**, 2011.

YOUNG, J. W.; HENRY, B. L.; GEYER, M. A. Predictive animal models of mania : hits , misses and. 2011.

ZHANG, L. et al. Protective effects of minocycline on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in serotonergic and dopaminergic neurons of mouse brain. **European Journal of Pharmacology**, 2006.

ZUNG, S.; MICHELON, L.; CORDEIRO, Q. O uso do lítio no transtorno afetivo bipolar. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 55, n. 1, p. 30–37, 2010.

**APÊNDICE****Apêndice a – Declaração aceite do comitê de ética**

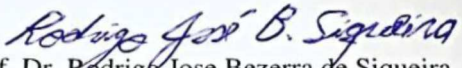
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 138/2014, sobre o projeto intitulado: “**ESTUDO COMPORTAMENTAL E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DA MINOCICLINA EM UM MODELO ANIMAL DO EPISÓDIO DE MANIA DO TRANSTORNO BIPOLAR**”, de responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macedo Gaspar e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em *Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 12 de dezembro de 2014.*

Fortaleza, 16 de dezembro de 2014

  
Prof. Dr. Rodrigo Jose Bezerra de Siqueira  
Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

## Apêndice b – Abstract artigo publicado na Revista Metabolic Brain Disease

Metab Brain Dis (2015) 30:1207–1215  
DOI 10.1007/s11011-015-9697-6



RESEARCH ARTICLE

### GBR 12909 administration as an animal model of bipolar mania: time course of behavioral, brain oxidative alterations and effect of mood stabilizing drugs

Ana Isabelle G. Queiroz<sup>1</sup> · Maíra Moraes de Araújo<sup>1</sup> · Tatiane da Silva Araújo<sup>1</sup> · Greicy Coelho de Souza<sup>1</sup> · Lígia Menezes Cavalcante<sup>1</sup> · Michel de Jesus Souza Machado<sup>1</sup> · David Freitas de Lucena<sup>1</sup> · João Quevedo<sup>2,3</sup> · Danidle Macêdo<sup>1,4</sup>

Received: 5 February 2015 / Accepted: 4 June 2015 / Published online: 16 June 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Polymorphisms in the human dopamine transporter (DAT) are associated with bipolar endophenotype. Based on this, the acute inhibition of DAT using GBR12909 causes behavioral alterations that are prevented by valproate (VAL), being related to a mania-like model. Herein our first aim was to analyze behavioral and brain oxidative alterations during a 24 h period post-GBR12909 to better characterize this model. Our second aim was to determine the preventive effects of lithium (Li) or VAL 2 h post-GBR12909. For this, adult male mice received GBR12909 or saline being evaluated at 2, 4, 8, 12 or 24 h post-administration. Hyperlocomotion, levels of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation in brain areas were assessed at all these time-points. GBR12909 caused hyperlocomotion at 2 and 24 h. Rearing behavior increased only at 2 h. GSH levels decreased in the hippocampus and striatum at the time points of 2, 4, 8 and 12 h. Increased lipid peroxidation was detected at the time-points of 2 and 12 h in all brain areas studied. At the time-point of 2 h post-GBR12909 Li prevented the hyperlocomotion and rearing

alterations, while VAL prevented only rearing alterations. Both drugs prevented pro-oxidative changes. In conclusion, we observed that the main behavioral and oxidative alterations took place at the time-period of 2 h post-GBR12909, what points to this time-period as the best for the assessment of alterations in this model. Furthermore, the present study expands the predictive validity of the model by the determination of the preventive effects of Li.

**Keywords** Bipolar disorder · Mania · GBR12909 · Valproate · Lithium · Mice

#### Introduction

Recurrent episodes of disturbed affect including mania and depression are core features of bipolar disorder (BD). Brain functions, such as cognition, seems to be impaired during the acute phases of BD, especially during manic states (Morice



## Apêndice c – Abstract artigo publicado no Journal of Affective Disorders

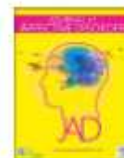
Journal of Affective Disorders 225 (2018) 40–51



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Affective Disorders

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jad](http://www.elsevier.com/locate/jad)



Research paper

### Antimanic activity of minocycline in a GBR12909-induced model of mania in mice: Possible role of antioxidant and neurotrophic mechanisms



Ana Isabelle G. de Queiroz<sup>a</sup>, Adriano José Maia Chaves Filho<sup>a</sup>, Tatiane da Silva Araújo<sup>a</sup>,  
Camila Nayane Carvalho Lima<sup>a</sup>, Michel de Jesus Souza Machado<sup>a</sup>, André F. Carvalho<sup>b</sup>,  
Silvania Maria Mendes Vasconcelos<sup>a</sup>, David Freitas de Lucena<sup>a</sup>, João Quevedo<sup>c,d,e,f</sup>,  
Danielle Macedo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Neuropharmacology Laboratory, Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Translational Psychiatry Research Group and the Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>c</sup> Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

<sup>d</sup> Center of Excellence on Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

<sup>e</sup> Neuroscience Graduate Program, The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX, USA

<sup>f</sup> Laboratory of Neurosciences, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords

Bipolar disorder  
Mania  
GBR12909  
Minocycline  
Lithium  
Valproate  
Risk taking behavior

#### ABSTRACT

**Background:** Mania/hypomania is the cardinal feature of bipolar disorder. Recently, single administration of the dopamine transporter (DAT) inhibitor, GBR12909, was related to mania-like alterations. In the present study we aimed at testing behavioral and brain oxidant/neurotrophic alterations induced by the repeated administration of GBR12909 and its prevention/reversal by the mood stabilizing drugs, lithium (Li) and valproate (VAL) as well as by the neuroprotective drug, minocycline (Mino).

**Methods:** Adult Swiss mice were submitted to 14 days protocols namely prevention and reversal. In the reversal protocol mice were given GBR12909 or saline and between days 8 and 14 received Li, VAL, Mino (25 or 50 mg/kg) or saline. In the prevention treatment, mice were pretreated with Li, VAL, Mino or saline prior to GBR12909. **Results:** GBR12909 repeated administration induced hyperlocomotion and increased risk taking behavior that were prevented and reversed by the mood stabilizers and both doses of Mino. Li, VAL or Mino were more effective in the reversal of striatal GSH alterations induced by GBR12909. Regarding lipid peroxidation Mino was more effective in the prevention and reversal of lipid peroxidation in the hippocampus whereas Li and VAL prevented this alteration in the striatum and PPC. Li, VAL and Mino25 reversed the decrease in BDNF levels induced by GBR12909.

**Conclusion:** GBR12909 repeated administration resembles manic phenotype. Similarly to classical mood-stabilizing agents, Mino prevented and reversed GBR12909 manic-like behavior in mice. Thus, our data provide preclinical support to the design of trials investigating Mino's possible antimanic effects.