



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

LETÍCIA RÉGIA LIMA CAVALCANTE

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO (ALA) EM
VIA DOPAMINÉRGICA NO MODELO DE MANIA INDUZIDO POR D-ANFETAMINA**

FORTALEZA

2020

LETÍCIA RÉGIA LIMA CAVALCANTE

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO (ALA) EM
VIA DOPAMINÉRGICA NO MODELO DE MANIA INDUZIDO POR D-ANFETAMINA**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio

Co-orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire

FORTALEZA

2020

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)

- C364i Cavalcante, Letícia Régia Lima.
Investigação do mecanismo de ação do ácido alfa-lipóico (ALA) em via dopaminérgica no modelo de mania induzido por D-anfetamina / Letícia Régia Lima Cavalcante. – 2020.
92 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio.
Coorientação: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.
1. Ácido alfa-lipóico. 2. Mania. 3. D-anfetamina. 4. Biologia computacional. 5. Receptores dopaminérgicos. I. Título.

CDD 615.1

LETÍCIA RÉGIA LIMA CAVALCANTE

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO (ALA) EM VIA
DOPAMINÉRGICA NO MODELO DE MANIA INDUZIDO POR D-ANFETAMINA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Valder Nogueira Freire (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Caren Nádia Soares de Sousa
Centro Universitário da Grande Fortaleza (UNIGRANDE)

Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Júnior
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lília e Reginaldo, por todo o amor, carinho e apoio, e por terem sempre priorizado a minha educação.

Ao meu irmão, Kauã, que me ensina e inspira tanto com sua pureza.

Ao meu companheiro de vida, João Melo, por todo o cuidado, carinho e compreensão. A vida é mais leve ao seu lado.

Agradeço à minha orientadora, professora Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio, a quem tenho muito carinho e admiração, pela confiança a mim creditada e por ter aberto as portas do seu laboratório pra mim.

Agradeço ao meu co-orientador, professor Valder Nogueira Freire, por todos os ensinamentos ao longo destes anos, pelas oportunidades proporcionadas a mim e pelo entusiasmo com a pesquisa científica.

À professora Danielle Macêdo Gaspar, por sua contribuição e apoio na realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, por todos os momentos compartilhados, pelo auxílio na realização do projeto e por tornarem a caminhada mais prazerosa.

À toda a equipe do Biotério, por trabalharem pela qualidade da pesquisa científica e sempre solícitos e aptos a resolver qualquer problema.

À Universidade Federal do Ceará e aos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que me proporcionaram excelente ensino, e aos técnicos e servidores que possibilitaram a realização deste projeto.

À banca examinadora pela atenção e contribuições acerca deste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que passaram pela minha vida e, de alguma forma, ajudaram a moldar quem eu sou hoje.

A perfeição não é alcançada quando
já não há mais nada para adicionar,
mas quando já não há mais nada
que se possa retirar.

– Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO (ALA) EM VIA DOPAMINÉRGICA NO MODELO DE MANIA INDUZIDO POR D-ANFETAMINA

O ácido α -lipóico (ALA) é um composto antioxidante e anti-inflamatório de ocorrência natural que tem sido amplamente estudado como adjuvante no tratamento de diversas doenças neuropsiquiátricas. Apesar da crescente lista de aplicações clínicas, os mecanismos de ação do ALA permanecem elusivos. Neste contexto, o tratamento farmacológico do transtorno afetivo bipolar (TAB) apresenta muitas limitações, principalmente relacionadas a seus efeitos adversos, sendo evidenciada a necessidade da busca por novas terapêuticas. Baseado nisto, o presente estudo foi proposto para investigar a ação do ALA em via dopaminérgica utilizando o modelo de mania induzido por D-anfetamina (ANF). Foram utilizados camundongos *Swiss SPF (specific pathogen free)* fêmeas (20-25g), provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram tratados com ANF (2 mg/kg, i.p.) ou salina (i.p.) por 14 dias e olanzapina (OLA, 2 mg/kg, i.p.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou ambas do 8^o ao 14^o dia do protocolo experimental. O peso dos animais foi registrado no 1^o e no 14^o dias de tratamento, imediatamente antes das administrações. Duas horas após a última administração de anfetamina, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto, labirinto em cruz elevado, interação social e labirinto em Y. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por decapitação e o hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) foram dissecados para a investigação dos níveis de dopamina (DA) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no HC e mensuração da expressão gênica dos receptores de dopamina D2 e D3 no CE. Foi observado que a administração de ALA em associação com OLA em camundongos fêmeas submetidos ao modelo de mania induzido por ANF foi efetiva na prevenção do ganho de peso causado por OLA nestes camundongos. Além disso, este estudo demonstrou a reversão da hiperlocomoção e comportamento exploratório no campo aberto induzidos pela administração crônica de ANF através dos tratamentos com OLA, ALA ou as duas drogas combinadas, e reversão do comportamento de risco induzido por ANF no labirinto em cruz elevado através da administração de ALA sozinho (no tempo de permanência nos braços abertos ou número de mergulhos) ou combinado com OLA (apenas no número de mergulhos). A administração crônica de ANF não causou alterações na sociabilidade e memória de trabalho destes animais. A análise neuroquímica revelou um aumento na razão DOPAC/DA no HC no grupo ANF em comparação ao controle. No CE, observamos um aumento da expressão do receptor D2 induzido por OLA, que foi revertido no tratamento com OLA e ALA em associação, e aumento da expressão do receptor D3 induzido por OLA ou ALA, também revertido no tratamento com as duas drogas em associação. Por fim, o estudo

computacional revelou uma possível interação do ALA no sítio ortostérico dos receptores de dopamina D2 e D3, através de um padrão diferente daquele observado para DA ou OLA. Juntos, estes resultados demonstram a reversão das alterações comportamentais induzidas por ANF através do uso do ALA, sozinho ou combinado com OLA, e dão suporte às evidências sobre a ação direta de ALA sobre a neurotransmissão dopaminérgica, além de indicar uma ação preferencial desta molécula sobre o sítio ortostérico dos receptores D3. Visto que o ALA já tem eficácia comprovada na clínica na reversão de diversos sintomas neuropsiquiátricos, este estudo buscou aprofundar os conhecimentos sobre os seus diversos sítios e mecanismos de ação, podendo ser útil na ampliação do seu uso clínico.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido α -lipóico; Mania; D-anfetamina; Biologia computacional; Receptores dopaminérgicos.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF ACTION OF α -LIPOIC ACID (ALA) ON DOPAMINERGIC PATHWAY IN THE D-AMPHETAMINE INDUCED MANIA MODEL

α -lipoic acid (ALA) is a naturally occurring antioxidant and anti-inflammatory compound that has been widely studied as an adjuvant in the treatment of various neuropsychiatric diseases. Despite the growing list of clinical applications, ALA's mechanisms of action remain elusive. In this context, the pharmacological treatment of bipolar affective disorder (BD) has several limitations, mainly related to its adverse effects, highlighting the need to search for new therapies. Based on this, the present study was proposed to investigate the action of ALA in the dopaminergic pathway using the mania model induced by D-amphetamine (ANF). Swiss SPF (specific pathogen free) female mice (20-25g), from the vivarium of the Nucleus for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará (UFC), were used. The animals were treated with ANF (2 mg / kg, ip) or saline (ip) for 14 days and olanzapine (OLA, 2 mg / kg, ip), ALA (100 mg / kg, vo) or both from the 8th to the 14th day of the experimental protocol. The animals' weight was recorded on the 1st and 14th days of treatment, immediately before the administrations. Two hours after the last amphetamine administration, the animals were submitted to open field, elevated plus maze, social interaction and Y-maze behavioral tests. Subsequently, the animals were euthanized by decapitation and the hippocampus (HC) and striatum (ST) were dissected to investigate the levels of dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in HC and to measure the gene expression of dopamine D2 and D3 receptors in ST. It was observed that the administration of ALA in association with OLA in female mice submitted to the ANF-induced mania model was effective in preventing the weight gain caused by OLA in these mice. In addition, this study demonstrated the reversal of hyperlocomotion and exploratory behavior in the open field induced by chronic administration of ANF through treatments with OLA, ALA or the two drugs combined, and reversal of risk behavior induced by ANF in the elevated plus-maze through the administration of ALA alone (in the length of stay in the open arms or number of head dips) or combined with OLA (only in the number of head dips). The chronic administration of ANF did not change the sociability and working memory of these animals. The neurochemical analysis revealed an increase in the DOPAC/DA ratio in HC in the ANF group compared to the control. In the ST, we observed an increase in the expression of the D2 receptor induced by OLA, which was reversed in the treatment with OLA and ALA in combination, and an increase in the expression of the D3 receptor induced by OLA or ALA, also reversed in the treatment with the two drugs in combination. Finally, the computational study revealed a possible interaction of ALA at the orthosteric site of dopamine D2 and D3 receptors, through a different pattern than that observed for DA or OLA. Together, these results demonstrate the

reversal of behavioral changes induced by ANF through the use of ALA, alone or combined with OLA, and support the evidence about the direct action of ALA on dopaminergic neurotransmission, in addition to indicating a preferential action of this molecule on the orthosteric site of D3 receptors. Since ALA already has proven efficacy in the clinic in reversing several neuropsychiatric symptoms, this study sought to deepen the knowledge about its different sites and mechanisms of action, and may be useful in expanding its clinical use.

KEYWORDS: α -lipoic acid; Mania; D-amphetamine; Computational biology; Dopamine receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias dopaminérgicas centrais.....	21
Figura 2 – Estrutura química do ácido α -lipóico (ALA).....	25
Figura 3 – Desenho experimental.....	33
Figura 4 – Estrutura química dos ligantes em estudo.....	39
Figura 5 – Alinhamento estrutural dos receptores dopaminérgicos D2 e D3.....	40
Figura 6 – Variação do peso corporal de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.	44
Figura 7 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a atividade locomotora e exploratória no teste de campo aberto.....	46
Figura 8 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o comportamento ansioso-símile no teste do labirinto em cruz elevado.....	47
Figura 9 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o número de mergulhos nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado.....	48
Figura 10 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a sociabilidade no teste de interação social.....	49
Figura 11 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre memória de trabalho no teste do labirinto em Y.....	50
Figura 12 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o turnover de dopamina no hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.....	51
Figura 13 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a expressão gênica do receptor de dopamina D2 no corpo estriado de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.....	52
Figura 14 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a expressão gênica do receptor de dopamina D3 no corpo estriado de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.....	53
Figura 15 – Representação tridimensional dos complexos D2-DA, D2-ALA e D2-OLA resultantes de docking molecular.....	54
Figura 16 – Representação tridimensional dos complexos D3-DA, D3-ALA e D3-OLA resultantes de docking molecular.....	54
Figura 17 – Perfil de interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D2 representado no painel BIRD.....	57

Figura 18 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D2.....	58
Figura 19 – Perfil de interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D3 representado no painel BIRD.....	59
Figura 20 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D3.....	60
Figura 21 – Perfil de interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D2 representado no painel BIRD.....	61
Figura 22 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D2.....	62
Figura 23 – Perfil de interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D3 representado no painel BIRD.....	63
Figura 24 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D3.....	64
Figura 25 – Perfil de interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D2 representado no painel BIRD.....	65
Figura 26 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D2.....	66
Figura 27 – Perfil de interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D3 representado no painel BIRD.....	67
Figura 28 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D3.....	68
Figura 29 – Energia total em função do raio interação dos complexos D2-DA, D2-ALA e D2-OLA analisado por bioquímica quântica.....	69
Figura 30 – Energia total em função do raio interação dos complexos D3-DA, D3-ALA e D3-OLA analisado por bioquímica quântica.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	Ácido α -lipóico
ANF	D-anfetamina
ATV	Área tegmental ventral
BIRD	Binding site, Interaction energy, and Residues Domain
cAMP	AMP cíclico
CE	Corpo estriado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
ECL	Extracelular loop
EPS	Sintomas extrapiramidais
GPCR	G protein-coupled receptors
HC	Hipocampo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MAO	Monoamina oxidase
MFCC	Molecular Fragmentation with Conjugate Caps
NEBA	Número de entradas no braço aberto
NEBF	Número de entradas no braço fechado
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos
OLA	Olanzapina
PDB	Protein Data Bank
PKC	Proteína cinase C
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAL	Salina
SPF	Specific pathogen free
TAB	Transtorno afetivo bipolar
TMH	Transmembrane helix
TPBA	Tempo de permanência no braço aberto

TPBF Tempo de permanência no braço fechado
UFC Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Transtorno Afetivo Bipolar.....	17
1.1.1 Tratamento Farmacológico do TAB.....	18
1.2 Sistema Dopaminérgico.....	20
1.3 Hipótese Dopaminérgica do TAB.....	22
1.4 Modelo animal de mania induzido por D-anfetamina.....	23
1.5 Ácido α-lipóico.....	24
1.6 Biologia computacional.....	26
1.6.1 <i>Docking</i> Molecular.....	27
1.6.2 Bioquímica Quântica.....	27
2. RELEVÂNCIA E JUTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
1.1 Objetivo Geral.....	30
1.2 Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Drogas.....	31
4.4.1 Anfetamina.....	31
4.4.2 Ácido α -Lipóico.....	31
4.4.3 Olanzapina.....	31
4.3 Desenho Experimental.....	32
4.4 Aferição do peso corporal dos animais.....	33
4.5 Avaliação Comportamental.....	33
4.5.1 Teste de campo aberto.....	33
4.5.2 Teste de labirinto em cruz elevado.....	34
4.5.3 Teste de interação social.....	34
4.5.4 Teste de labirinto em Y.....	34
4.6 Testes Neuroquímicos.....	35
4.6.1 Dosagem de dopamina e ácido 3,4-diidroxifenilacético.....	35

4.6.2 Análise de expressão gênica.....	35
4.7 Análise Estatística.....	37
4.8 Métodos computacionais.....	37
4.8.1 <i>Docking</i> molecular.....	37
4.8.2 Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas.....	41
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o peso corporal de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por anfetamina.....	44
5.2 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a atividade locomotora e exploratória no teste de campo aberto.....	45
5.3 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o comportamento ansioso-símile no teste do labirinto em cruz elevado.....	46
5.4 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a sociabilidade no teste de interação social.....	48
5.5 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre memória de trabalho no teste do labirinto em Y.....	49
5.6 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o <i>turnover</i> de dopamina no hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.....	50
5.7 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a expressão gênica dos receptores de dopamina D2 e D3 no corpo estriado de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.....	51
5.8 Estudo da interação de DA, ALA e OLA no sítio ortostérico dos receptores de dopamina D2 e D3.....	53
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno Afetivo Bipolar

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno psiquiátrico caracterizado pela oscilação entre períodos de depressão e períodos de humor altamente elevado, sendo este último estado referido como mania, quando mais severo, ou hipomania, quando mais branda. Estas alternâncias entre extremos de humor são observadas na história da humanidade desde os tempos antigos, tendo sido primeiramente descrita por Hipócrates (460-377 a.C.) (ANGST; MARNEROS, 2001). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição (DSM-V) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), a característica essencial do episódio maníaco é o período de humor notavelmente alterado, que deve permanecer elevado, expansivo ou irritável por, no mínimo, uma semana. Além disso, para confirmar o diagnóstico, é necessária a presença concomitante de três ou mais dos seguintes sintomas: aumento da atividade dirigida à objetivos ou agitação psicomotora, necessidade de sono reduzida, envolvimento constante em atividades com elevado potencial de risco, autoestima aumentada, aumento da fala, fuga de ideias e distraibilidade.

O TAB é classificado em três tipos principais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). O tipo 1 define-se quando há pelo menos um episódio de mania, com ou sem episódios de depressão, enquanto no tipo 2 há pelo menos um episódio de hipomania, mas não de mania, e um de depressão maior. O terceiro tipo, chamado de transtorno ciclotímico, envolve vários períodos com sintomas hipomaníacos ou depressivos, mas que se apresentam de maneira insuficiente para satisfazer os critérios de definição do TAB tipo 1 ou 2.

O transtorno afetivo bipolar traz importante impacto individual e social. Episódios recorrentes de mania e depressão podem causar graves deficiências funcionais, como desempenho irregular no trabalho, aumento das taxas de divórcio e dificuldade de socialização (GROVER; NEHRA; THAKUR, 2017; KAPCZINSKI *et al.*, 2016). Ademais, há um alto risco de mortalidade associado com o TAB, visto que de 30 a 50% dos pacientes chegam a cometer tentativas de suicídio (SCHAFFER *et al.*, 2015), conferindo ao TAB a maior taxa de suicídio entre os distúrbios afetivos (GONDA *et al.*, 2012).

Considerando os tipos 1 e 2, o TAB afeta mais de 1% da população em geral, independente de etnia, nacionalidade ou posição econômica (VIETA *et al.*, 2018). Apesar de não haver diferença na incidência do TAB tipo 1 em relação ao gênero, pacientes do sexo feminino apresentam maior susceptibilidade à ciclagem rápida ou episódios mistos e taxas mais altas de transtornos alimentares e transtorno por uso de álcool (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Além disso, evidências apontam que o TAB tipo 2 é mais comum em mulheres do que em homens (NIVOLI *et al.*, 2011).

Apesar dos esforços voltados para o estudo do TAB, sua etiologia permanece incerta. Atualmente, existem evidências para a presença de alterações estruturais e funcionais no cérebro (HIBAR *et al.*, 2018; PHILLIPS; SWARTZ, 2014; WISE *et al.*, 2016), em marcadores de estresse oxidativo (BROWN; ANDREAZZA; YOUNG, 2014), na função mitocondrial (ANDREAZZA; DUONG; YOUNG, 2018), em marcadores inflamatórios (GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016), no ciclo circadiano (MELO *et al.*, 2017) e no sistema dopaminérgico (ASHOK *et al.*, 2017). Porém, ainda é um desafio interligar estes achados e distinguir entre as causas e efeitos secundários ao distúrbio (HARRISON; GEDDES; TUNBRIDGE, 2018).

Sabe-se que tanto fatores genéticos quanto ambientais estão envolvidos no transtorno bipolar (MÜHLEISEN *et al.*, 2014). Os fatores genéticos parecem ser responsáveis por grande parte do risco de desenvolver o TAB, sendo que os descendentes de um indivíduo afetado tem este risco aumentado em cerca de 10 vezes (CRADDOCK; SKLAR, 2013). Por outro lado, os fatores de risco ambientais assemelham-se àqueles que também são fatores de risco para o desenvolvimento de vários outros distúrbios psiquiátricos, não parecendo haver especificidade para o TAB (MARANGONI; FAEDDA; BALDESSARINI, 2018).

1.1.1 Tratamento Farmacológico do TAB

De acordo com (SCAINI *et al.*, 2020), a única droga considerada estabilizadora do humor e, portanto, específica para o tratamento do TAB, é o lítio. Somado a isto, estão a alta toxicidade do lítio, principalmente para os rins e glândulas tireoide e paratireoide, e seus efeitos colaterais, que vão de náuseas, diarreia e tremores até prejuízo cognitivo (GITLIN, 2016). Dessa forma, a terapêutica do TAB se

baseia muito em drogas desenvolvidas para o tratamento de outras doenças neuropsiquiátricas.

O tratamento do TAB geralmente começa com o objetivo de levar o paciente com mania ou depressão à reversão dos sintomas e ao humor estável (BUTLER *et al.*, 2018). Isto é um problema especialmente relevante no tratamento da fase depressiva do TAB, onde são utilizados os antidepressivos. Tem sido amplamente observado que o tratamento com estas drogas em monoterapia pode induzir a reversão da depressão para um quadro de mania (VERMA; MOHAPATRA, 2015). Assim, o uso de antidepressivos no TAB deve ser feito em associação com uma droga para o controle da mania.

Na fase da mania, uma classe de drogas muito utilizadas são os antipsicóticos. Os antipsicóticos de segunda geração (ou atípicos) apresentam como principal vantagem um menor risco de indução de sintomas extrapiramidais (EPS) em relação aos antipsicóticos clássicos. Dentre estas drogas, a olanzapina destaca-se como o primeiro antipsicótico atípico a ser indicado para o tratamento de episódios de mania aguda (NARASIMHAN; BRUCE; MASAND, 2007). O mecanismo de ação da olanzapina é baseado principalmente no antagonismo dos receptores de dopamina, responsável pelo controle dos sintomas positivos, e serotonina, que ajuda a diminuir os sintomas negativos. Evidências sugerem uma menor ocupação da olanzapina nos receptores D2/D3 das regiões nigrostriatais do que das regiões mesolímbicas (KESSLER *et al.*, 2005; BIGLIANI *et al.*, 2000), o que poderia explicar a diminuição da ocorrência de EPS.

Apesar dos benefícios, um efeito adverso comum gerado por antipsicóticos atípicos é o ganho de peso induzido pelo tratamento, com alto risco de efeitos metabólicos e cardiovasculares (UÇOK; GAEBEL, 2008). Assim, o tratamento com olanzapina é associado à sensibilidade à insulina reduzida, intolerância à glicose e ao desenvolvimento de comorbidades como diabetes mellitus e doenças cardiovasculares, o que leva ao comprometimento da adesão dos pacientes ao tratamento.

Diante do exposto, é possível perceber que o tratamento farmacológico do TAB ainda tem eficácia limitada em estabilizar a doença a longo prazo (BUTLER *et al.*, 2018). Uma grande barreira é encontrar um equilíbrio entre os extremos da

doença, sendo que o tratamento de um quadro pode acabar revertendo ao outro. Além disso, a terapêutica atual falha em prevenir o dano residual e deficiência funcional progressiva observados em pacientes com TAB (SCAINI *et al.*, 2020).

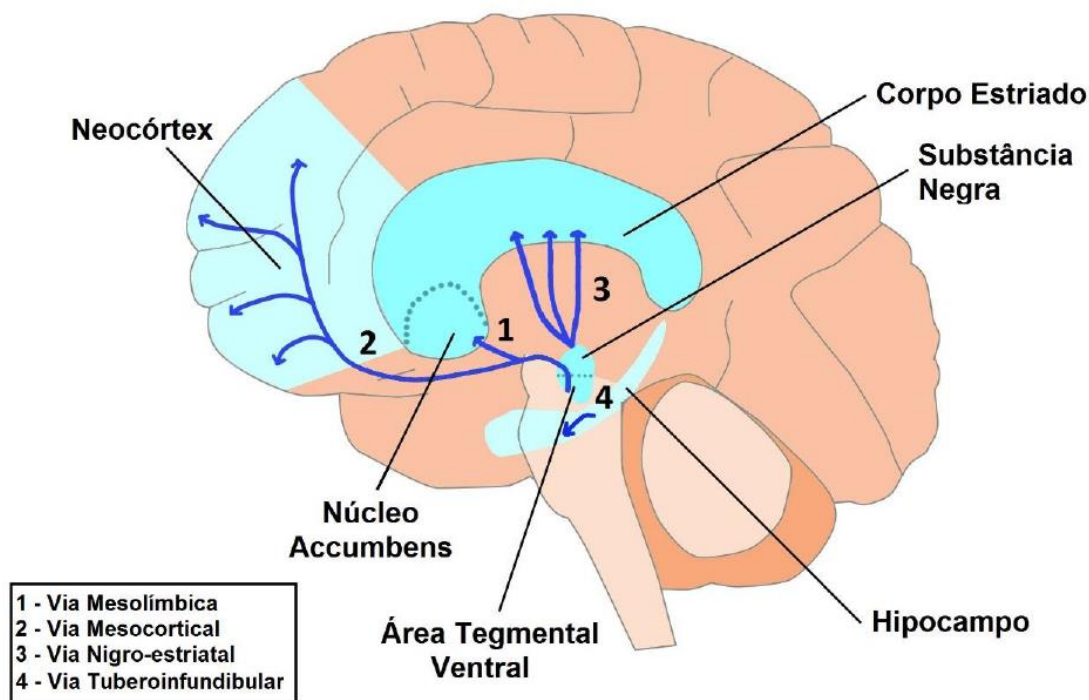
1.2 Sistema Dopaminérgico

A dopamina (DA) é um neurotransmissor presente tanto no sistema nervoso periférico quanto central, cuja atividade está envolvida em processos neurológicos vitais, tais como os mecanismos de recompensa, controle das emoções, movimento e funções cognitivas (KLEIN *et al.*, 2018). Uma vez que várias das funções do sistema dopaminérgico estão relacionadas com a sintomatologia do TAB, ele é descrito como sendo um dos principais neurotransmissores envolvidos neste distúrbio.

A transmissão dopaminérgica ocorre por quatro vias centrais (Figura 1):

- Via mesolímbica: projeções da área tegmental ventral (ATV) à componentes do sistema límbico (núcleo acumbens, hipocampo e amígdala). Está envolvida na regulação de emoções e motivação.
- Via mesocortical: projeções da ATV às áreas corticais límbicas, como o córtex piriforme, entorrinal e principalmente para o córtex pré-frontal. Relacionada com funções cognitivas, memória, atenção, comportamentos emocionais e aprendizagem.
- Via nigroestriatal: projeta-se da substância negra ao estriado. Relaciona-se à coordenação de movimentos voluntários. Deficiências nessa via estão relacionados à distúrbios motores, como acatisia, distonia, tremores, etc.
- Via tuberoinfundibular: projeções do núcleo arqueado do hipotálamo à glândula pituitária, envolvida principalmente no controle de prolactina.

Figura 1 – Vias dopaminérgicas centrais.



Fonte: Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University *website*, adaptado. Disponível em: <https://www.oist.jp/news-center/photos/dopamine-pathways>.

A dopamina desempenha seu efeito biológico interagindo com receptores específicos pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR, do inglês: *G protein-coupled receptors*), cujos membros apresentam considerável conservação de sequência, especialmente em seus domínios transmembrana (ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009). Estes receptores possuem, na porção citoplasmática, uma proteína de ligação a nucleotídeos de guanosina (proteína G), que tem a capacidade de ativar cascatas de sinalização através da ativação de enzimas efetoras responsáveis pela síntese de segundos mensageiros intracelulares.

Os receptores de dopamina são divididos em duas subfamílias: D1-símile (D1 e D5) e D2-símile (D2, D3 e D4), distinção baseada tanto na identidade de sequência como nas diferenças de sinalização intracelular (MISSALE *et al.*, 1998). Os receptores D1-símile são constituídos por uma longa cauda C-terminal e uma alça citoplasmática curta entre as hélices transmembranares 5 e 6. Os integrantes dessa família ativam a enzima adenilil ciclase através da subunidade alfa da proteína G estimulatória (G_s), aumentando os níveis de AMP cíclico (cAMP), assim como também aumentam a concentração de Ca^{2+} intracelular, e ativam a proteína cinase C (PKC). Os receptores

D2-símile apresentam uma cauda C-terminal curta e uma longa alça citoplasmática entre as hélices 5 e 6. Esses receptores são acoplados à proteína G inibitória (Gi) com efeito inibitório sobre a adenilil ciclase, reduzindo os níveis de cAMP e Ca²⁺ intracelular e hiperpolarizando a célula (MISSALE *et al.*, 1998).

Dentre os receptores dopaminérgicos de origem humana, o D2, D3 e D4 possuem suas estruturas depositadas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*). O receptor D3 (PDB: 3PBL) foi o primeiro a ter sua estrutura elucidada, tendo sido co-cristalizado com o seu antagonista eticloprida e suas coordenadas atômicas determinadas por meio da técnica de difração de raios X, com resolução final de 2,89 Å (CHIEN *et al.*, 2010). Recentemente, as estruturas dos receptores D2 (PDB: 6CM4, resolução: 2,867 Å) e D4 (PDB: 4WIU, resolução: 1,962 Å) também puderam ser determinadas por meio da mesma técnica, tendo estes receptores sido co-cristalizados com seus antagonistas risperidona e nemoraprida, respectivamente (WANG *et al.*, 2017, 2018). A disponibilidade destas estruturas cristalográficas representa uma nova possibilidade de estudo do funcionamento deste receptor através de técnicas de biologia estrutural e computacional.

1.3 Hipótese Dopaminérgica do TAB

Como citado anteriormente, o TAB envolve alterações entre estados de mania e de depressão, sendo a última caracterizada por baixos níveis de noradrenalina, serotonina e dopamina no cérebro. Estas monoaminas atuam modulando diversas funções relacionadas ao sistema límbico, funções endócrinas, metabólicas e, principalmente, o comportamento, sendo que o mecanismo de ação das drogas antidepressivas é baseado neste aspecto. Assim, eles atuam de forma a aumentar a disponibilidade destes neurotransmissores nas fendas sinápticas. Bottlender e colaboradores observaram que, quando tratados com antidepressivos, pacientes bipolares deprimidos alternavam o seu quadro depressivo para o maníaco, especialmente se tratados com antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase (MAO) (BOTTLENDER *et al.*, 1998). Este fato é uma evidência de que alterações na regulação dos sistemas de monoaminas estariam envolvidas no TAB.

Neste contexto, vários dos sintomas de humor, cognição e comportamento observados no TAB podem estar relacionados com a hiperatividade do sistema dopaminérgico, especificamente. Esta relação pode ser melhor estabelecida através

da observação de que substâncias psicoestimulantes, que aumentam a atividade de dopamina no cérebro, como as anfetaminas (BERK *et al.*, 2007), e a L-dopa, que é um precursor da dopamina, podem desencadear crises de mania em pacientes bipolares ou com predisposição ao transtorno afetivo bipolar (ACKENHEIL, 2001; BUNNEY *et al.*, 1972; GERNER; POST; BUNNEY, 1976). Além disto, o uso de drogas psicoestimulantes produz uma apresentação clínica similar à mania em pacientes normais (JACOBS; SILVERSTONE, 1986). As alterações dos níveis de dopamina que ocorrem entre os episódios de mania e depressão no TAB são descritas como a síndrome da desregulação dopaminérgica (BERK *et al.*, 2007).

Os achados em cérebros de pacientes em estado maníaco indicam aumento da atividade cerebral no hipocampo e corpo estriado e diminuição da atividade no córtex pré-frontal em comparação a controles saudáveis (BROOKS; HOBLYN; KETTER, 2010; HULVERSHORN *et al.*, 2012). Este desequilíbrio pode resultar em irritabilidade, impulsividade, reações emocionais exacerbadas e disfunção cognitiva (MALETIC; RAISON, 2014). Entretanto, estes autores argumentam que o quadro clínico do TAB não parece ser explicado por mudanças em áreas específicas, mas sim por alterações em redes neurais interconectadas.

1.4 Modelo animal de mania induzido por D-anfetamina

Dada a característica complexa do TAB de oscilação entre quadros opostos (mania e depressão), torna-se um desafio encontrar modelos animais que mimetizem o distúrbio como um todo. No entanto, baseando-se nas observações acerca do TAB, modelos animais puderam ser desenvolvidos para o estudo da mania separadamente. Dentre eles está o modelo de mania induzido por D-anfetamina, reconhecido como o “padrão ouro” para o estudo da mania (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). A hiperatividade induzida por anfetamina foi inicialmente proposta com a coadministração de clordiazepóxido e dexanfetamina (DAVIES *et al.*, 1974) e, mais tarde, com a administração de D-anfetamina na dose de 1,5 mg/kg (CAPPELIEZ; MOORE, 1990).

Dentre as características deste modelo estão o aumento da atividade locomotora, que representa sua validade de face, a presença de achados fisiológicos registrados no TAB, como a exacerbação do sistema dopaminérgico e estresse

oxidativo, representando sua validade de constructo, e a possibilidade de reversão do quadro por estabilizadores do humor e outras drogas utilizadas na clínica, como lítio e valproato, representando sua validade preditiva (ARENT *et al.*, 2011; MACÊDO *et al.*, 2012; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004; NESTLER *et al.*, 2002). Novos modelos animais estão sendo desenvolvidos no sentido de tentar reproduzir a ciclagem de humor presente no TAB e entender as mudanças fisiológicas que levam à ocorrência destes episódios (VALVASSORI *et al.*, 2019; YOUNG; DULCIS, 2015).

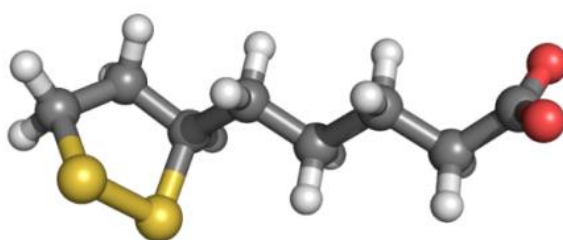
Uma vez administrada, a anfetamina causa um aumento dos níveis extracelulares de dopamina, principalmente no corpo estriado, por diferentes mecanismos (CALIPARI; FERRIS, 2013). Ela atua como substrato do transportador de dopamina (DAT), assim inibindo competitivamente a recaptação de dopamina da fenda sináptica, antecipa a liberação de vesículas de dopamina e, ainda, promove o transporte reverso de dopamina através do DAT. As principais vias dopaminérgicas envolvidas nos efeitos comportamentais induzidos pela anfetamina são as vias nigroestriatal e mesolímbica (YATES *et al.*, 2007). Estudos recentes demonstram que a administração de anfetamina causa alterações morfológicas e morte neuronal no hipocampo (ARROYO-GARCÍA *et al.*, 2020) e a ativação persistente desta área cerebral estaria relacionada com a sensibilização comportamental a anfetamina (LODGE; GRACE, 2008).

1.5 Ácido α -lipóico

O ácido α -lipóico (ALA) é um composto antioxidante e anti-inflamatório de ocorrência natural que está envolvido no metabolismo energético das células. Ele pode existir na forma de dois enantiômeros (R e S), apesar de apenas a forma R ocorrer naturalmente. O ALA é um composto anfipático cuja estrutura química apresenta dois grupos tióis, que podem estar na forma oxidada ou reduzida (Figura 2). Assim, o ALA (forma oxidada) e sua forma reduzida, denominada ácido dihidrolipóico (DHHLA), formam um poderoso par redox que atua tanto em meio aquoso como lipídico, atribuindo a este composto a característica de participar de uma variedade de reações bioquímicas de oxirredução e atuar em diferentes moléculas (DE ARAÚJO *et al.*, 2013). Este ácido é um componente importante de um complexo mitocondrial de quatro proteínas que fazem parte do metabolismo da glicina, além de

ser cofator do complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (HILLER *et al.*, 2016). Um fator importante sobre o ALA é que, além da sua alta capacidade antioxidante própria, ele consegue também recuperar as formas reduzidas de outros antioxidantes naturais presentes nas células. Além de possuir a atividade de eliminar radicais livres (PACKER; KRAEMER; RIMBACH, 2001), o ALA também atua como quelante metálico (GHIBU *et al.*, 2009) e agente restaurador dos níveis intracelulares de glutathiona reduzida.

Figura 2 – Estrutura química do ácido α -lipóico (ALA).



Fonte: Elaborado pela autora. Estrutura mostrada em visualização bola e bastão, com os carbonos coloridos em cinza, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios em branco.

Devido às suas atividades biológicas, o ALA tem sido amplamente estudado. Este composto demonstra múltiplos efeitos benéficos, especialmente no tratamento de doenças neuropsiquiátricas que envolvem mecanismos inflamatórios e oxidativos (SOUSA, C. *et al.*, 2018; TIBULLO *et al.*, 2017). Perera e colaboradores (PERERA *et al.*, 2011) demonstraram que o tratamento com ALA reduziu significativamente o dano neuronal decorrente da indução de estresse oxidativo. De modo similar, Paradells-Navarro e colaboradores (PARADELLS-NAVARRO *et al.*, 2017) demonstraram o efeito neuroprotetor de ALA em células nervosas submetidas a estresse oxidativo e relacionaram o efeito observado com o aumento da razão GSH/GSG, resultante da conversão da forma oxidada para a forma reduzida de glutathiona. Assim, acredita-se que a ação neuroprotetora ALA esteja relacionada, principalmente, com sua atividade antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017).

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que ocorre no estresse oxidativo pode estimular e acelerar processos inflamatórios (MITTAL *et al.*, 2014), de modo que o ALA também atua na prevenção destes processos. Dessa forma, diversos autores apontam os efeitos benéficos de ALA no sistema nervoso

central relacionados a neuroinflamação e sugerem seu uso terapêutico e nutracêutico (ARROLL; WILDER; NEIL, 2014; SHAY *et al.*, 2009).

Dentre os mecanismos que poderiam explicar os efeitos benéficos de ALA em doenças neuropsiquiátricas está sua possível ação sobre o sistema dopaminérgico. Um estudo demonstrou que ALA reverte o aumento da expressão de D2 induzida por haloperidol, um antipsicótico de primeira geração, sugerindo que ALA tem parcial efeito sinérgico com drogas antipsicóticas pelo mesmo mecanismo (DESLAURIERS *et al.*, 2014). De fato, a ação adjuvante do ácido α -lipóico em associação com drogas antidepressivas e antipsicóticas vem sendo investigada com sucesso em nosso grupo de pesquisa (SAMPAIO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016; SOUSA, C. *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015). Alguns de nossos estudos recentes demonstraram efeito sinérgico do ALA com clorpromazina ou clozapina em modelos animais de esquizofrenia induzida por cetamina (SAMPAIO *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento com ALA resultou na melhora do comportamento depressivo, redução dos níveis de estresse oxidativo, diminuição do comprometimento cognitivo e social e aumento do suporte neurotrófico em modelos animais de depressão (SILVA *et al.*, 2013, 2016; SOUSA, C. *et al.*, 2015).

Em adição aos efeitos no sistema nervoso central, é sabido que o ALA tem um impacto positivo no metabolismo. Estudos pré-clínicos indicam uma redução da atividade de AMPK no hipotálamo induzida por ALA. Este mecanismo reduz a sensação de fome, levando à diminuição da ingestão de alimentos e, principalmente, à perda de peso (PRIETO-HONTORIA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010). Com relação aos estudos em humanos, também há evidências de uma atividade anti-obesidade do ALA (HUERTA *et al.*, 2015; KOH *et al.*, 2011), embora os efeitos sobre a perda de peso pareçam ser limitados, pois alguns estudos indicam que o ALA não influencia o peso corporal (ANSAR *et al.*, 2011; MCNEILLY *et al.*, 2011). Apesar disso, o ALA também demonstrou aumentar a sensibilidade à insulina e prevenir a síndrome metabólica (PACKER *et al.*, 2001; ZIEGLER, 2004).

1.6 Biologia computacional

As técnicas de biologia computacional têm como objetivo avaliar e interpretar sistemas biológicos complexos por meio de uma descrição física dos componentes do

sistema. A execução deste tipo de análise requer, inicialmente, que o alvo proteico tenha a sua estrutura tridimensional elucidada. Assim, a aplicação da biologia computacional se beneficia da disponibilidade de técnicas que permitem a determinação das estruturas tridimensionais de macromoléculas, como as técnicas de difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) ou a modelagem molecular por homologia (BLUNDELL *et al.*, 2006; RAHA, 2007.; MATTA, 2010; ZHOU, 2010). Abordagens computacionais baseadas em estrutura para o estudo de interações entre proteínas e ligantes incluem o *docking* molecular e a dinâmica molecular, sendo ambos os métodos baseados em mecânica clássica (SLIWOSKI *et al.*, 2014), e estratégias que permitem calcular a energia de interação de sistemas biológicos a nível quântico, que permitem uma maior acurácia nas análises (HAFNER, 2010).

1.6.1 *Docking* Molecular

O *docking* molecular (ou atracamento molecular) é um método que permite prever o modo de ligação mais provável de um ligante com uma proteína para formar um complexo estável (LENGAUER; RAREY, 1996). Este método é apontado como uma poderosa ferramenta para descoberta de drogas baseada em estrutura, já que considera exatamente a complementaridade estrutural entre uma molécula e um alvo proteico. Além de abordagens para desenvolvimento de fármacos, o *docking* molecular também tem sido utilizado para elucidar processos bioquímicos ou expandir a compreensão sobre o modo de interação entre ligantes e macromoléculas ou, até mesmo, entre macromoléculas distintas (KITCHEN *et al.*, 2004; LENGAUER; RAREY, 1996).

O método é composto por um algoritmo de busca, que investiga possíveis conformações e orientações do ligante no sítio alvo considerando interações eletrostáticas, de van der Waals e a complementaridade estrutural, e uma função de avaliação de energia, denominada função *score*, que determina aquelas mais relevantes (GUEDES, 2014). Diversos *softwares* para cálculos de *docking* molecular estão disponíveis atualmente, cada um com seu algoritmo de busca e função *score* próprios (VERLI, 2014).

1.6.2 Bioquímica quântica

Os métodos de mecânica quântica apresentam uma grande vantagem em relação a métodos baseados em mecânica molecular por conta da sua elevada

acurácia. Porém, o cálculo mecânico quântico preciso de energias de interação para moléculas biológicas representa um grande desafio em bioquímica computacional, pois as biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos normalmente possuem um grande número de átomos, demandando elevada capacidade computacional.

O Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC, do inglês, *Molecular Fractionation with Conjugate Caps*) é um método que permite aplicar mecânica quântica para obter uma descrição precisa de sistemas biológicos, fornecendo cálculos *ab initio* de energias de interação entre, por exemplo, um fármaco e seu alvo proteico (ZHANG; ZHANG, 2003). A técnica consiste na fragmentação de sistemas compostos por grandes moléculas, como proteínas, em pequenas partes que conservam as propriedades eletrônicas e estruturais do sistema. Desta forma, é possível calcular a energia individual de cada uma destas partes e obter a energia total do sistema (OURIQUE *et al.*, 2016).

A aplicação de cálculos de bioquímica quântica pode ter um importante impacto na predição de afinidades de ligação e cálculo das energias envolvidas em interações proteína-ligante. Desta forma, a técnica pode servir como base para a descrição do modo de interação de drogas existentes com alvos proteicos, bem como para a concepção de novos agentes terapêuticos. Cálculos quânticos foram aplicados na investigação de possíveis novos compostos inibitórios ao vírus da dengue (OURIQUE *et al.*, 2016). SOUSA *et al.* (2016) mostraram, por meio de análise quântica, como ocorre a interação entre dois complexos proteicos envolvidos no equilíbrio de modelação óssea do corpo humano. ZANATTA *et al.* (2012) utilizaram a mesma metodologia para demonstrar como ocorre a interação do antipsicótico eticloprida com o receptor D3.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Para além dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, evidências apontam para uma influência do ALA no sistema dopaminérgico no cérebro (DESLAURIES *et al.*, 2011). Enquanto isso, o estudo da hiperatividade induzida por anfetamina tem sido largamente utilizado como um modelo para o estudo da mania. Macedo *et al.* (2012) utilizaram o modelo de mania induzida por anfetamina e demonstraram a reversão do comportamento hiperativo em camundongos por ALA nas doses de 50 ou 100 mg/kg. No presente estudo, pretende-se avaliar o efeito do ALA sobre o comportamento e sobre a neurotransmissão dopaminérgica em animais submetidos ao modelo de mania induzido por anfetamina, a fim de investigar o seu mecanismo de ação em via dopaminérgica, bem como sua possível ligação em receptores D2 e D3 através de docking molecular.

Como discutido anteriormente, o tratamento farmacológico do TAB apresenta limitações que vão desde a dificuldade em alcançar um equilíbrio entre os extremos da doença até a quantidade excessiva de efeitos colaterais associados. Além disso, as drogas atualmente utilizadas falham em prevenir o dano residual e deficiência funcional progressivos observados no TAB. Tendo em vista os múltiplos efeitos benéficos do ALA e o importante componente oxidativo associado ao TAB, torna-se atrativo o uso deste composto para o tratamento de pacientes bipolares. Estudos mais aprofundados sobre os diversos sítios de ação do ALA poderão ter implicações na ampliação do seu uso clínico, podendo compor novas formulações eficazes no tratamento de doenças neuropsiquiátricas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do ALA, sozinho ou em associação com OLA, sobre o comportamento e neurotransmissão dopaminérgica em animais submetidos ao modelo de mania induzido por D-anfetamina.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração de ALA, sozinho ou em associação com OLA, sobre o peso corporal de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por D-anfetamina.

- Determinar o efeito da administração de ALA, sozinho ou em associação com OLA, na atividade locomotora e exploratória, comportamento ansioso-símile ou de risco, sociabilidade e memória de trabalho de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por D-anfetamina.

- Mensurar os níveis de dopamina e seus metabólitos no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por D-anfetamina tratados com ALA sozinho ou em associação com OLA.

- Determinar os níveis expressão gênica dos receptores de dopamina D2 e D3 no corpo estriado de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por D-anfetamina tratados com ALA sozinho ou em associação com OLA.

- Investigar a interação do ALA e OLA com os receptores D2 e D3 através de ensaios computacionais de *docking* molecular e bioquímica quântica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss SPF (do inglês, *specific pathogen free*) fêmeas, com peso entre 20-25g, provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará. Os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de doze horas e recebendo água e comida à vontade. Foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que estão em conformidade com as normas internacionais de pesquisas científicas envolvendo animais (NIH, 1996). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob o N° de aprovação: 4796010219.

4.2 Drogas

4.2.1 Anfetamina

A D-anfetamina (Sigma-Aldrich), ou ANF, foi suspensa em solução salina e administrada por via intraperitoneal (i.p.) durante 14 dias consecutivos na dose de 2 mg/kg (MACEDO et al., 2012).

4.2.2 Ácido α -Lipóico

O ácido α -lipóico (Sigma-Aldrich), ou ALA, foi dissolvido em celulose e água destilada e administrado por via oral (v.o.) durante 7 dias consecutivos (8^o ao 14^o dia de tratamento) na dose de 100 mg/kg, de acordo com estudo prévio que comparou as doses de 100 e 200 mg/kg no modelo de mania induzido por D-anfetamina em camundongos (MACEDO et al., 2012).

4.2.3 Olanzapina

A olanzapina, ou OLA, foi suspensa em solução salina e administrada por via oral (v.o.) durante 7 dias consecutivos (8^o ao 14^o dia de tratamento) na dose de 2 mg/kg (XIMENES et al., 2018).

4.3 Desenho experimental

O protocolo a seguir foi proposto para avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração do ALA e OLA em animais submetidos ao modelo de mania induzido por anfetamina. Para estes experimentos, os animais foram divididos conforme os grupos experimentais abaixo:

-Grupo controle: animais submetidos a uma injeção diária de solução salina por via intraperitoneal (i.p.) durante 14 dias.

-Grupo mania induzida por anfetamina: animais submetidos a uma injeção diária de anfetamina 2 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) durante 14 dias.

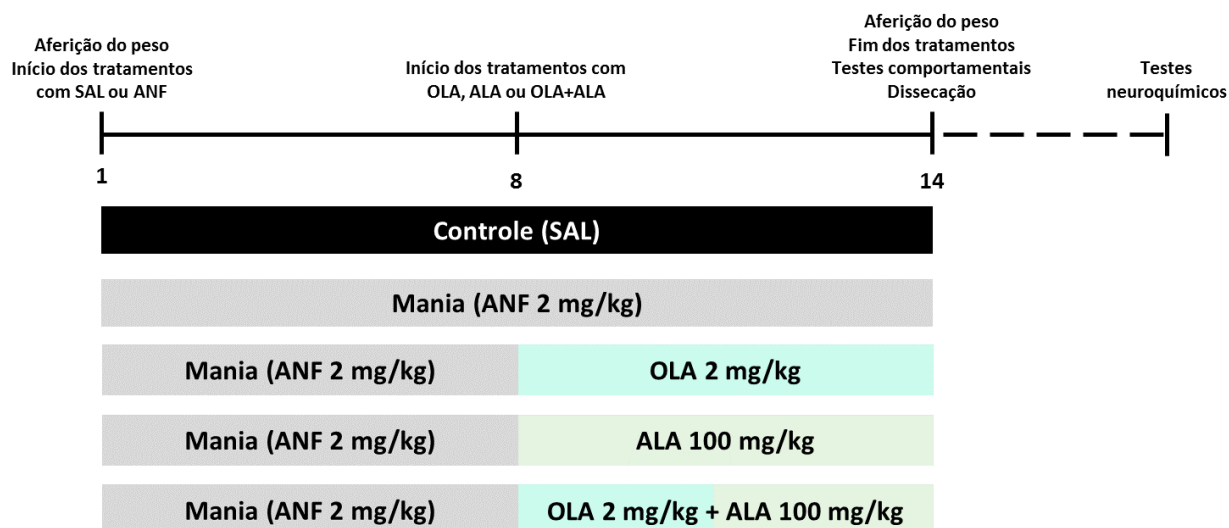
-Grupo mania induzida por anfetamina tratado com ALA: animais submetidos a uma injeção diária de anfetamina 2 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) durante 14 dias e uma administração diária de ALA 100 mg/kg por via oral (v.o.) entre o 8º e o 14º dia.

-Grupo mania induzida por anfetamina tratado com OLA: animais submetidos a uma injeção diária de anfetamina 2 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) durante 14 dias e uma administração diária de OLA 2 mg/kg por via oral (v.o.) entre o 8º e o 14º dia.

-Grupo mania induzida por anfetamina tratado com OLA e ALA: animais submetidos a uma injeção diária de anfetamina 2 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) durante 14 dias. No grupo de associação, os animais receberam entre o 8º e o 14º dia uma administração diária de OLA 2 mg/kg por via oral (v.o.) e, após 30 minutos, uma administração de ALA 100 mg/kg por via oral (v.o.).

As administrações foram realizadas sempre pela manhã, sendo que a OLA era administrada 30 minutos após ANF e o ALA era administrado 30 minutos após ANF ou OLA (no grupo de associação). No décimo quarto dia do protocolo, duas horas após a administração de anfetamina, os animais foram submetidos a testes comportamentais. Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram dessecadas as áreas cerebrais do hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) para a realização dos testes neuroquímicos.

Figura 3 – Desenho experimental.



Fonte: Elaborado pela autora. Camundongos *Swiss* fêmeas receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

4.4 Aferição do peso corporal dos animais

Os animais foram pesados no primeiro dia e no último dia de tratamento, pela manhã, imediatamente antes da primeira administração do dia. Os resultados foram expressos em termos da variação de peso ao longo do tratamento, calculada a partir da fórmula: (variação do peso) = (peso no último dia) – (peso no primeiro dia), em que um resultado maior que zero indica ganho de peso, menor que zero indica perda de peso e igual a zero indica que o peso não variou.

4.5 Avaliação comportamental

4.5.1 Teste do campo aberto

Este teste é utilizado para avaliação da atividade exploratória do animal e consiste em observar e registrar o número de cruzamentos com as quatro patas (“*crossing*”), o número de comportamentos de autolimpeza (“*grooming*”) e o número de explorações verticais (“*rearing*”) executados durante 5 minutos de permanência em uma caixa de acrílico de paredes transparentes e piso preto (30 x 30 x 15 cm) dividida em 9 quadrantes iguais após 1 minuto de habituação (ARCHER, 1973). Neste teste,

também foi registrado o tempo que o animal permaneceu no quadrante central do aparato.

4.5.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O comportamento do tipo ansioso foi avaliado a partir do teste do labirinto em cruz elevado realizado em um aparato formado por dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, conectados em forma de cruz por uma plataforma central (5 x 5 cm) e suspensos a 45cm do chão. A plataforma central e as paredes laterais dos braços fechados são feitas de acrílico transparente e o chão de acrílico preto. Os camundongos foram colocados na plataforma central e durante 5 minutos os seguintes parâmetros foram registrados: número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), número de entradas no braço fechado (NEBF), tempo de permanência no braço fechado (TPBF) e número de mergulhos nos braços abertos (LISTER, 1987).

4.5.3 Teste de interação social

Para avaliação do comportamento social, os animais serão colocados em uma caixa com 3 compartimentos: um compartimento contendo um animal de mesmo sexo e idade dentro de uma gaiola (câmara social), um compartimento neutro e outro compartimento contendo uma gaiola sem animal. Durante 5 minutos de observação serão mensurados o tempo de permanência no compartimento com o animal e no compartimento contendo a gaiola sem animal (KOSHIMIZU; LEITER; MIYAKAWA, 2012). Em seguida será utilizada a seguinte fórmula: (% do tempo gasto na câmara social) – (% do tempo gasto na câmara contendo uma gaiola sem animal).

4.5.4 Teste do labirinto em Y

Para avaliar a memória de trabalho e comportamento cognitivo exploratório dos animais, utilizou-se o teste do labirinto em Y. O aparato 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 porcentagem 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).

4.6 Testes neuroquímicos

Os animais foram sacrificados por decapitação no último dia de tratamento, imediatamente após os testes comportamentais, e seus cérebros foram removidos e lavados em salina gelada. As áreas cerebrais do hipocampo (HC) e do corpo estriado (CE) dos animais foram dissecadas sobre o gelo, congeladas e armazenadas a -70°C até serem utilizadas para os testes neuroquímicos.

4.6.1 Dosagem dos níveis de dopamina (DA) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC)

As determinações das concentrações de DA e DOPAC no HC foram realizadas através do sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO₄) 1% (1:4) e centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Em seguida, as amostras foram enviadas para análise.

4.6.2 Análise de expressão gênica

Foi realizada a avaliação da expressão gênica dos receptores dopaminérgicos D2 e D3 no CE através da técnica de PCR quantitativa em tempo real.

-Obtenção das amostras

As áreas cerebrais dos animais foram coletadas em microtubo contendo 100µL de RNA later (Sigma, EUA) e, em seguida, armazenados no freezer a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

-Extração do RNA

O RNA total de cada amostra foi isolado usando kit de extração de RNA (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos das áreas cerebrais dos animais foram macerados em nitrogênio líquido e adicionadas em tubo contendo 100 µL de tampão de lise. Então, adicionou-se às amostras 350 µL de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em

seguida, as amostras foram aquecidas por três minutos a 70°C, com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucléicos, e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo, onde adicionou-se 200 µL de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura foi transferida para um *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 14000 g por um minuto. Adicionou-se 600 µL de solução de lavagem e, em seguida, os tubos foram centrifugados em 14000 g por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras foram tratadas com DNase para reduzir a contaminação com DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Decorrido este tempo, foram adicionados 200 µL de solução de parada da DNase e as amostras foram centrifugadas por 1 min a 14000 g.

Logo em seguida, adicionou-se tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas novamente por 1 min a 14000 g. Adicionou-se 250 µL de tampão de lavagem, seguida de centrifugação por 2 min em 14000 g. Na etapa seguinte, o *spin* foi inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 µL de água livre de nuclease foi adicionado e os microtubos foram centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* foi descartado e o RNA eluído foi armazenado no freezer -70°C.

Após a extração do RNA de cada amostra, é efetuada a sua quantificação, com 1µL de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, 71 EUA). Concomitante a dosagem em ng/µL, realiza-se a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual é obtida por meio da relação da absorbância em 260/280 nm, fornecida pelo *software* acoplado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da etapa de síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).

-Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, USA), de acordo com instruções do fabricante. O volume final de cada amostra foi de 20µL: 2 µL do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 µL de oligonucleotídeos; 2 µL de primer; 1 µL da enzima transcriptase reversa; 1ng de RNA, onde o volume utilizado em µL é dependente da concentração inicial extraída; H2O de nucleases para completar 20 µL. O protocolo da reação foi realizado

à 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até a sua utilização no RT-PCR.

-PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

A expressão gênica foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (Light cycler 96, Roche), utilizando kit de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante. O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Foram utilizados primers desenhados especificamente para cada um dos receptores dopaminérgicos D2 e D3. Os valores de *threshold cycle* (Cq ou Ct), obtidos pelo *software* do equipamento, dos genes avaliados serão exportados para o Office Excel Microsoft 2010, no qual os níveis relativos de RNAm serão calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador, utilizando o programa GraphPad Prism 6. Para comparação de dados não paramétricos foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney como testes *post hoc*. Já nos dados paramétricos, foram utilizados a análise de variância One-Way ANOVA e o teste de Tukey como *post hoc* teste para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$ e os dados foram expressos como média \pm EPM.

4.8 Métodos computacionais

4.8.1 Docking molecular

A dopamina (DA), o ácido α -lipóico (ALA) e a olanzapina (OLA) foram analisados quanto ao seu modo de ligação nos receptores de dopamina D2 e D3. As estruturas tridimensionais dos receptores D2 e D3 foram obtidas do banco de dados *Protein Data Bank* sob os códigos de acesso 6CM4 e 3PBL, respectivamente.

Inicialmente foram removidas as moléculas de água da estrutura. A seguir, foi realizada uma análise de protonação da estrutura em pH 7,4 com auxílio do servidor PDB2PQR, e os hidrogênios ausentes foram adicionados de acordo com o pKa calculado para cada resíduo. As posições dos hidrogênios adicionados foram otimizadas por meio de mecânica clássica, mantendo-se as coordenadas originais

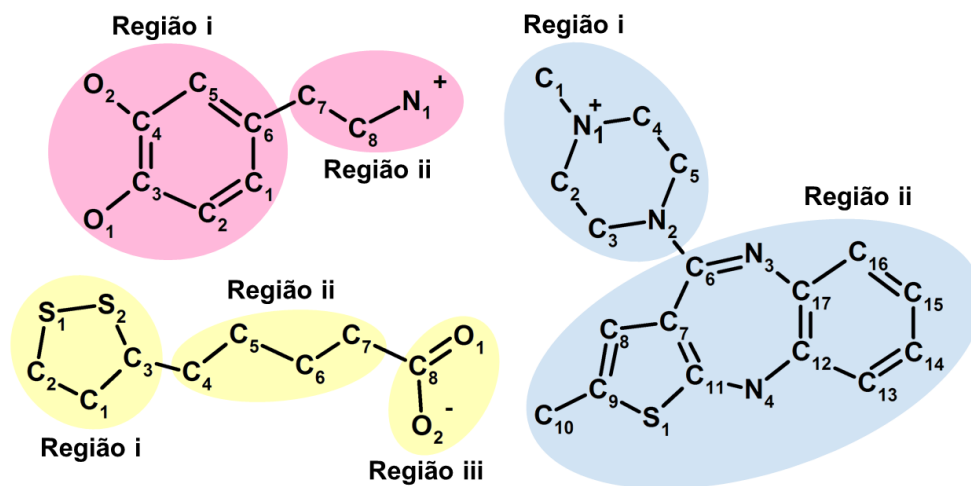
para os demais átomos, utilizando o campo de força CHARMM27 através do programa Discovery Studio (Accelrys Software Inc., San Diego), que possui parâmetros específicos para aminoácidos (BROOKS et al., 2009; MACKERELL et al., 1998).

A estrutura química dos ligantes (DA, ALA e OLA) foi obtida do banco de dados PubCHEM e foi realizado o estudo de protonação através do *software* Marvin Sketch versão 5.4.1.0 (CHEMAXON, 2013). Neste estudo, foi considerada a espécie química mais abundante em pH 7,4 de cada ligante.

Para os cálculos de *docking* molecular, foi utilizado o Algoritmo Genético Lamarckiano (GA) do *software* Autodock4, versão 4.2.6 (HUEY; MORRIS, 2003). A interface gráfica do programa AutoDockTools (The Scripps Research Institute), versão 1.5.6, foi utilizada para a remoção de hidrogênios não polares, a adição de cargas parciais (Gasteiger charges) e geração do arquivo da proteína em formato PDBQT. O receptor foi mantido estático, enquanto os ligantes (DA, ALA e OLA) foram mantidos flexíveis no sistema. A área de busca do *docking* foi definida com as dimensões x, y e z de 50 Å x 50 Å x 50 Å e *spacing* de 0,375 Å, centralizada de acordo com a posição do ligante co-cristalizado com o receptor.

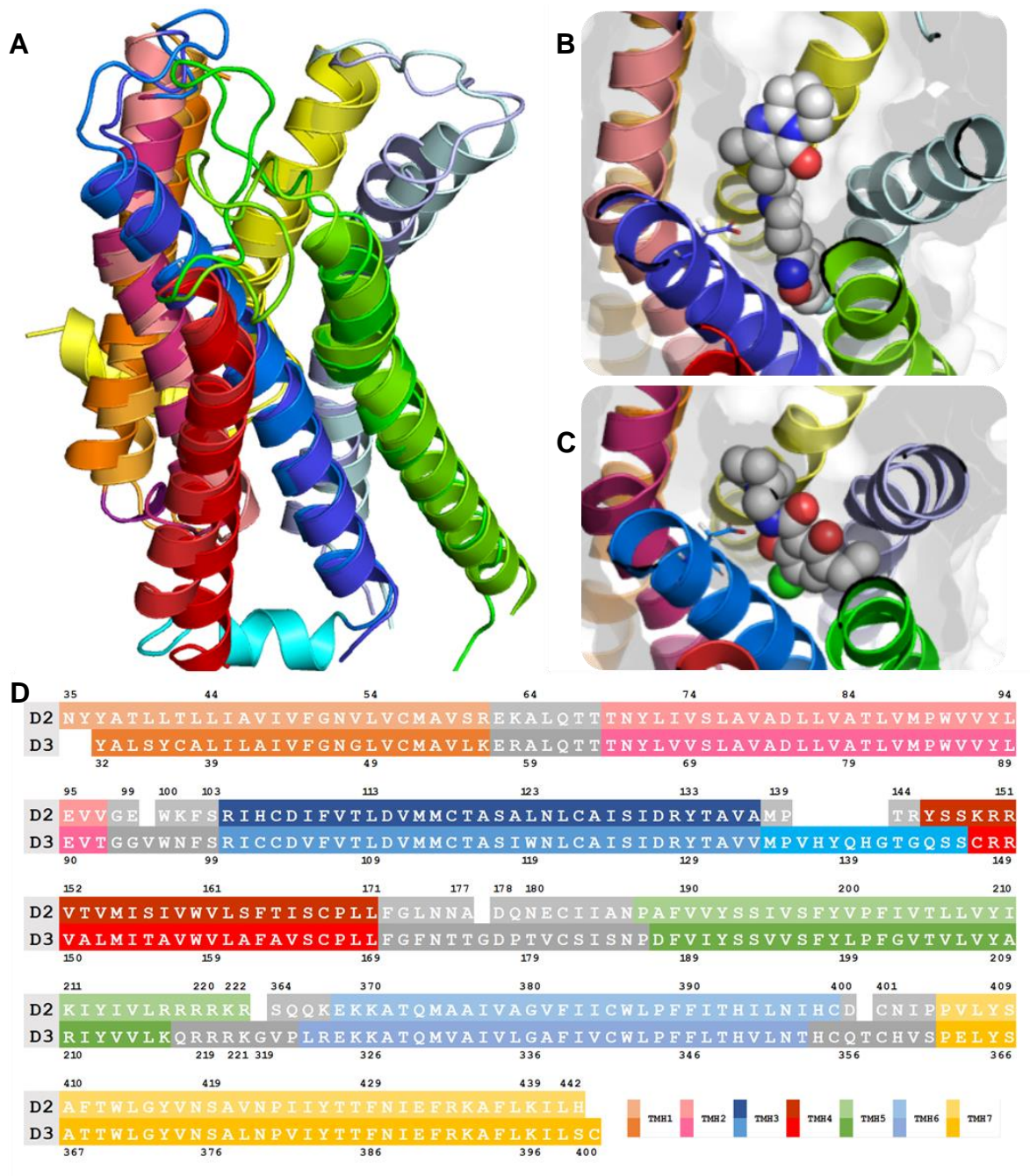
Foram realizados 50 ensaios de *docking* para cada complexo receptor-ligante estudado, com 25.000.000 avaliações de energia por rodada, tamanho da população ajustado para 150 e um máximo de 27.000 gerações por corrida. Foram obtidas 500 poses (10 poses por *docking*) para cada complexo, que foram agrupadas em *clusters* utilizando uma tolerância RMSD de 2,0 Å usando o programa AutoDockTools (HUEY; MORRIS, 2003). Assim, a pose final para cada complexo foi selecionada considerando-se o docking score, o número de poses no cluster e a inspeção visual das estruturas.

Figura 4 – Estrutura química dos ligantes em estudo.



Estrutura química da dopamina (rosa): a região i contém o grupamento catecol e a região ii contém a calda com uma amina primária protonadas na ponta. Estrutura química do ácido lipóico (amarelo): a região i contém um anel ditiolano, a região ii é composta por uma sequência hidrocarboneto e a região iii contém um grupamento carboxílico. Estrutura química da olanzapina (azul): a região i contém um grupamento piperazina e a região ii é formada por um anel tricíclico.

Figura 5 – Alinhamento estrutural dos receptores dopaminérgicos humanos D2 e D3.



Fonte: Elaborado pela autora. (A) Representação das estruturas cristalográfica dos receptores D2 (PDB: 6CM4) e D3 (PDB: 3PBL) em *cartoon*, coloridos de acordo com as hélices transmembranares (TMH1-7). (B) Sítio de ligação da risperidona co-cristalizada no receptor D2. (C) Sítio de ligação da eticloprida co-cristalizada no receptor D3. (D) Alinhamento de sequência dos receptores D2 e D3 com as hélices transmembranares identificadas de acordo com a representação em *cartoon* dos receptores.

4.8.2 Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas

A contribuição energética de todos os resíduos envolvidos na interação dos ligantes (DA, ALA e OLA) com os receptores foi determinada por meio de cálculos de mecânica quântica. Para essa proposta, foi utilizado o método MFCC (do inglês *Molecular Fragmentation with Conjugate Caps*), que permite a aplicação de métodos quânticos na análise das energias de ligação em sistemas biológicos, decompondo a estrutura tridimensional do complexo em fragmentos de aminoácidos que serão tratados como capas moleculares, simulando as propriedades locais de interação. O uso desta técnica permitiu o cálculo quântico da energia de interação individual de cada aminoácido presente no sítio de ligação, o qual foi realizado utilizando-se a Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*), por meio do software DMOL3 (DELLEY, 1990) implementado no Materials Studio 7.0 (Accelrys Software Inc., 2013).

Nesse método, as capas moleculares escolhidas para um dado resíduo foram os aminoácidos anterior e posterior na sequência da proteína. O esquema MFCC é uma aproximação de escala linear que se baseia nas propriedades locais de interação, considerando que a energia de interação numa região é geralmente localizada e decai rapidamente fora dela. A ideia principal do método MFCC é estimar a energia de interação através da quebra das ligações peptídicas, inserindo capas que preservem as características do ambiente ao redor da ligação quebrada (ZHANG; ZHANG, 2003). Para a descrição de interações envolvendo proteínas será utilizado o método MFCC aplicado por RODRIGUES *et al.* (2013).

Para identificar os resíduos componentes da interface no sistema proteína/ligante, foi traçado um raio imaginário de 5,0 Å a partir da superfície do ligante, sendo selecionados os resíduos com pelo menos um átomo dentro desse raio. Assim, foram traçados raios de 2,0 até 10 Å de distância a partir da molécula do ligante, variando 0,5 Å em cada medida, de modo que foi possível identificar em qual raio de distância em relação ao ligante encontrava-se cada resíduo. O método DFT, implementado no programa DMOL3 da suíte Materials (Accelrys Software Inc., San Diego), foi utilizado para a descrição de todas as interações.

Os parâmetros utilizados no cálculo quântico por meio de DFT para o cálculo quântico incluíram o uso da funcional de aproximação do gradiente generalizado

(GGA, do inglês *Generalized Gradient Approximation*) com parametrização PBE (PERDEW et al., 1996), um conjunto de bases para descrever orbitais (DNP+, do inglês *Double Numeric Polarization Plus*) e um método de correção (TS). As constantes dielétricas são amplamente utilizadas no estudo das propriedades eletrostáticas de biomoléculas. Neste trabalho, foi adotada uma constante dielétrica homogênea de 40 como padrão, de acordo com OURIQUE *et al.* (2016).

A descrição das interações para cada resíduo de interesse (R_i) da proteína considerou, além dele, suas capas moleculares correspondendo aos resíduos anterior ($R_i - 1$) e posterior ($R_i + 1$) a ele e o ligante (L_i). Para cada resíduo, foram gerados quatro sistemas e calculada a energia de cada um deles separadamente. O primeiro sistema incluía o ligante, o resíduo de interesse e suas capas moleculares, o segundo incluía apenas pelo resíduo de interesse com suas capas moleculares, o terceiro sistema incluía apenas o ligante e as capas moleculares do resíduo de interesse e o quarto sistema incluía apenas as capas moleculares do resíduo de interesse. A partir das energias de cada um destes sistemas, foi realizada a operação algébrica definida a seguir, que tem como resultado a energia isolada entre o resíduo de interesse da proteína e o ligante, levando em consideração a influência das capas moleculares na interação. Assim, a energia de interação de um resíduo R_i com um ligante L_i é definida por:

$$E (L_i R_i) = E (L_i R_{i-1} R_i R_{i+1}) - E (R_{i-1} R_i R_{i+1}) - E (L_i R_{i-1} R_{i+1}) + E (R_{i-1} R_{i+1})$$

A energia total de ligação de cada complexo receptor-ligante foi obtida através da soma algébrica das contribuições individuais de cada resíduo de aminoácido posicionado dentro do raio de 5,0 Å a partir do ligante. O gráfico da energia total do sistema por raio de interação, também denominado gráfico de convergência de energia, permite observar o ponto de convergência do sistema, ou seja, a partir do qual não são mais observados incrementos importantes de energia. Neste trabalho, a convergência foi considerada quando não houve variação de mais de 10% nos raios subsequentes. O gráfico de energia por cada raio de interação permite definir em que raio encontram-se os resíduos com maiores contribuições para a energia do sistema.

Já as energias de interação individuais dos resíduos de aminoácidos dos receptores com os ligantes, foram plotadas em um painel denominado BIRD (do inglês, *Binding site, Interaction energy, and Residues Domain*), que descreve os resíduos mais importantes energeticamente para a interação dos complexos. Estão presentes no painel criado todos os resíduos considerados no estudo. Dentre as informações presentes, estão a energia de ligação em kcal/mol de cada resíduo com o ligante, o respectivo raio de distância em que se encontra o resíduo analisado da molécula do ligante e a estrutura secundária do receptor da qual o resíduo pertence.

5 RESULTADOS

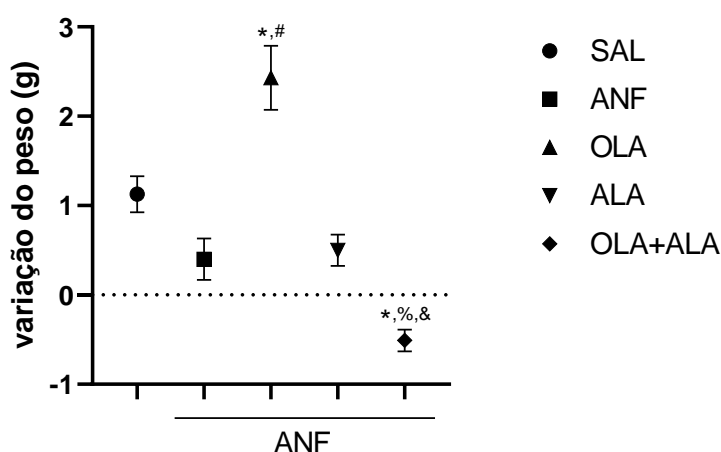
5.1 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o peso corporal de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por anfetamina

O peso dos animais foi registrado antes do início e ao final do protocolo para verificar possíveis alterações da variação de peso em decorrência dos tratamentos. A análise de variância (One way ANOVA) revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias [F (4, 47) = 23,32; P<0,0001].

Foi possível observar que o tratamento com OLA nos animais submetidos a administração crônica de anfetamina gerou um aumento da variação de peso destes animais quando comparado ao controle (p = 0,0014) ou ao grupo ANF (p < 0,0001).

No grupo com administração crônica de anfetamina tratado com OLA e ALA em associação, foi possível observar uma diminuição da variação de peso em relação ao controle (p < 0,0001) e aos grupos ANF tratados apenas com OLA (p < 0,0001) ou apenas com ALA (p = 0,0137), demonstrando que o ALA foi capaz de reverter o aumento no ganho de peso promovido pela administração de OLA (ANF+OLA).

Figura 6 – Variação do peso corporal de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.



Variação do peso dos animais entre o 1º e 14º dias de tratamento. Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada ponto representa a média ± EPM (n = 9-12). Na figura, * P<0,05 quando comparado com o grupo controle (SAL); # P<0,05 quando comparado com o grupo modelo (ANF); & P<0,5 quando comparado com o grupo ALA; % P<0,05 quando comparado com o grupo OLA. Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α-lipóico.

5.2 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a atividade locomotora e exploratória no teste de campo aberto

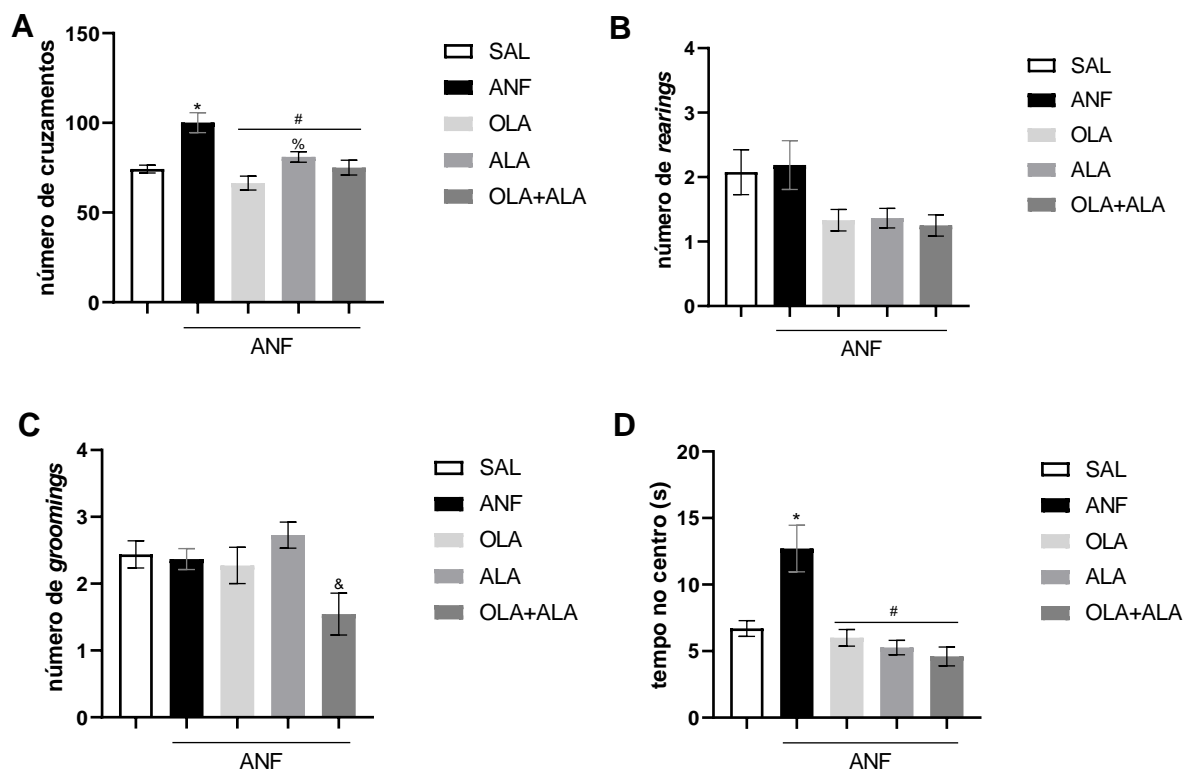
No teste de campo aberto foram registrados o número de cruzamentos (*crossings*), número de explorações verticais (*rearings*), número de comportamentos de autolimpeza (*groomings*) e o tempo gasto no quadrante central do aparato.

A análise de variância (One way ANOVA) do número de *crossings* revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias [$F(4, 44) = 10,59; P < 0,0001$]. A administração crônica de anfetamina provocou um aumento da atividade locomotora horizontal (*crossings*) no grupo ANF em comparação ao grupo SAL ($p = 0,0002$), tendo este efeito sido revertido pelos tratamentos com OLA ($p < 0,0001$), com ALA ($p = 0,0097$), ou pela associação das duas drogas ($p = 0,0006$). Houve diferença significativa entre o número de cruzamentos do grupo OLA com relação ao grupo ALA ($p = 0,0469$), apesar de nenhum dos tratamentos ter sido diferente do controle.

O teste de Kruskal-Wallis, utilizado para dados não paramétricos, não revelou nenhuma alteração do número de *rearings* ($P = 0,2079$) nos grupos estudados. Já para o número de *groomings*, houve alteração significativa entre as médias ($P = 0,0180$). Curiosamente, o tratamento com a associação de OLA e ALA nos camundongos submetidos à administração crônica de anfetamina causou uma redução significativa no comportamento de autolimpeza (*grooming*) quando comparado ao tratamento com ALA sozinho ($p = 0,0114$).

No que diz respeito à atividade no centro do aparato, a ANOVA de uma via revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias [$F(4, 51) = 9,883; P < 0,0001$]. A administração crônica de anfetamina causou um aumento no tempo de permanência no quadrante central comparado ao controle ($p = 0,0026$), enquanto que todos os tratamentos testados (OLA: $p = 0,0004$; ALA: $p = <0,0001$; ou OLA+ALA: $p = < 0,0001$) foram capazes de reverter este efeito.

Figura 7 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a atividade locomotora e exploratória no teste de campo aberto.



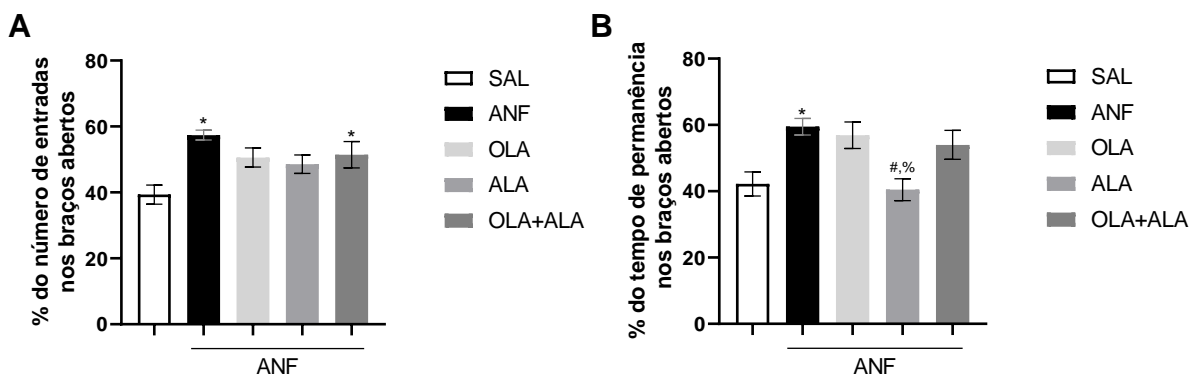
Número de cruzamentos (A), tempo de permanência no centro (B), número de *rearings* (C) e número de *groomings* (D) no teste do campo aberto. Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média \pm EPM (n = 8-11). Na figura, * P<0,05 quando comparado com o grupo controle (SAL); # P<0,05 quando comparado com o grupo modelo (ANF); % P<0,5 quando comparado com o grupo OLA. Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

5.3 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o comportamento ansioso-símile no teste do labirinto em cruz elevado

No teste de labirinto em cruz elevado foram registrados o número de entradas nos braços abertos ou fechados e o tempo gasto nos braços abertos ou fechados, sendo os resultados expressos em porcentagem de entradas e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos. A análise de variância (One way ANOVA) revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias de porcentagem de entradas nos braços abertos [F (4, 44) = 4,749; P = 0,0028] e entre as médias de porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos [F (4, 43) = 5,128; P=0,0018].

A administração crônica de anfetamina provocou o aumento geral na atividade dos animais nos braços abertos. Assim, tanto a porcentagem do número de entradas nos braços abertos ($p = 0,0009$) quanto do tempo de permanência nestes braços ($p = 0,0184$) no grupo ANF foram maiores comparados ao grupo SAL. Em relação à porcentagem do número de entradas nos braços abertos, nenhum dos tratamentos testados foi capaz de reverter o efeito observado no grupo ANF. Ademais, o grupo tratado com OLA e ALA em associação apresentou um aumento em relação ao controle ($p = 0,0477$). Já para a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, apenas o tratamento com ALA sozinho (ANF+ALA: $p = 0,0129$) foi capaz de reverter o efeito causado pela anfetamina.

Figura 8 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o comportamento ansioso-símile no teste do labirinto em cruz elevado.

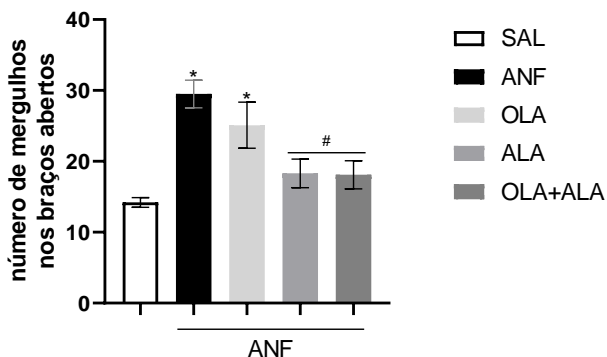


Porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A) e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do labirinto em cruz elevado. Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média \pm EPM ($n = 9-11$). Na figura, * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (ANF); % $P < 0,05$ quando comparado com o grupo OLA. Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

Também foi observado no teste de labirinto em cruz elevado o número de mergulhos (*head dips*) nos braços abertos. A análise de variância (One way ANOVA) deste parâmetro revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias [$F(4, 46) = 7,734$; $P < 0,0001$]. Foi observado que houve um aumento do número de mergulhos no grupo ANF quando comparado ao grupo SAL ($p = 0,0001$). Efeito semelhante também foi observado no grupo tratado apenas com OLA (ANF+OLA: $p = 0,0077$) em relação ao controle. Ademais, apenas os animais tratados com ALA

sozinho (ANF+ALA: $p = 0,0073$) ou em associação com OLA (ANF+OLA+ALA: $p = 0,0061$) apresentaram reversão deste efeito.

Figura 9 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o número de mergulhos nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado.

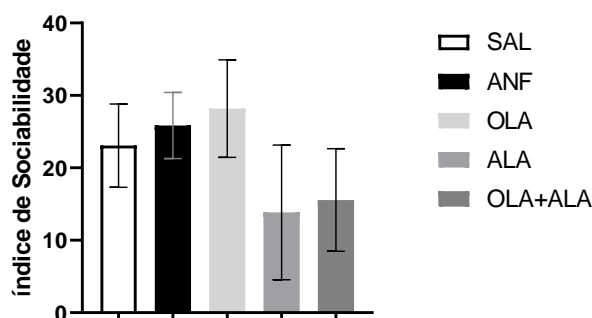


Número de mergulhos nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado. Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média ± EPM ($n = 10-11$). Na figura, * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (ANF). Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

5.4 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a sociabilidade no teste de interação social

No teste de interação social, os animais são avaliados quanto a preferência em permanecer numa câmara isolada ou na presença de outro animal. A análise de variância (One way ANOVA) não demonstrou diferença significativa entre as médias dos grupos estudados com relação à sociabilidade [$F(4, 26) = 0,8554$; $P = 0,5035$].

Figura 10 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a sociabilidade no teste de interação social.



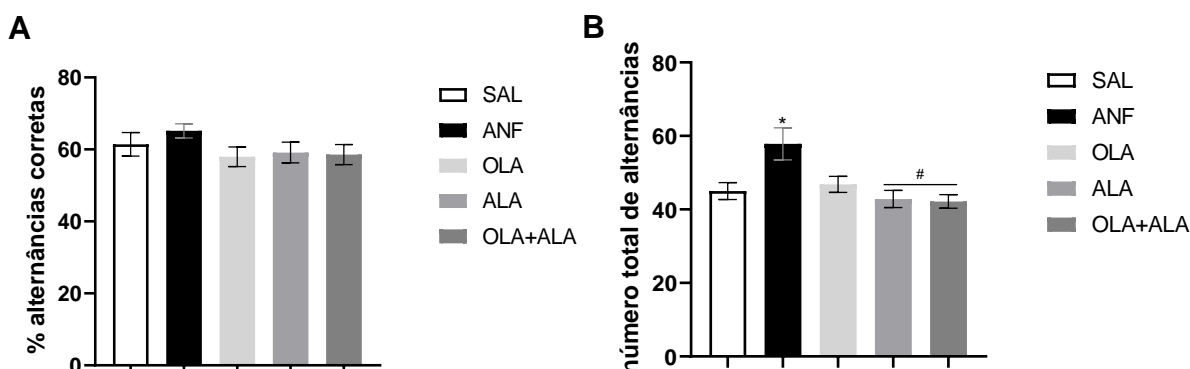
Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média ± EPM (n = 6). Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

5.5 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre memória de trabalho no teste do labirinto em Y

O teste de labirinto em Y é utilizado para avaliar a função cognitiva dos animais, em que a porcentagem de alternâncias corretas reflete a memória de trabalho. No presente estudo, a análise de variância (One way ANOVA) não demonstrou diferença estatística entre as médias dos grupos estudados com relação à memória de trabalho dos animais [F (4, 25) = 1,124; P = 0,3677].

Ao considerar o número total de alternâncias, a ANOVA indicou diferença significativa entre as médias [F (4, 25) = 5,335; P = 0,0030]. Foi possível observar que os animais submetidos ao modelo de mania induzido por ANF apresentaram um aumento no número total de alternâncias em relação ao grupo SAL (p = 0,0225), efeito este que foi revertido pelo tratamento com ALA sozinho (ANF+ALA: p = 0,0060) ou associado a OLA (ANF+OLA+ALA: p = 0,0039).

Figura 11 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre memória de trabalho no teste do labirinto em Y.



Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média \pm EPM (n = 6). Na figura, * P<0,05 quando comparado com o grupo controle (SAL); # P<0,05 quando comparado com o grupo modelo (ANF). Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

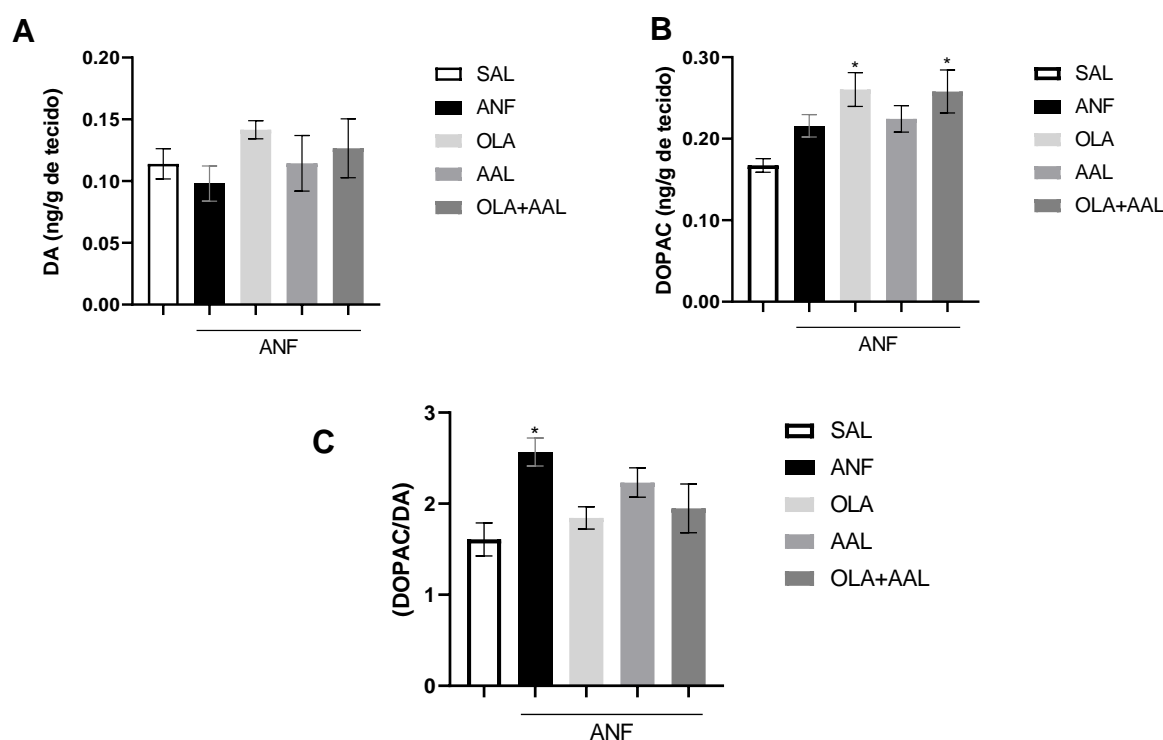
5.6 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o *turnover* de dopamina no hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina

Os níveis de dopamina (DA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), um metabólito de dopamina, no hipocampo foram determinados através do método HPLC. A partir destes dados, foi calculada a razão DOPAC/DA, utilizada como uma medida do *turnover* de dopamina.

De acordo com a ANOVA, nenhuma alteração nos níveis hipocámpais de DA pôde ser observada nos grupos estudados [F (4, 37) = 0,6661; P = 0,6196]. Entretanto, houve diferença significativa entre as médias dos grupos em relação aos níveis de DOPAC [F (4, 38) = 4,822; P = 0,0030] e da razão DOPAC/DA [F (4, 33) = 4,729; P = 0,0040], conforme descrito abaixo.

Os grupos tratados com OLA (ANF+OLA: p = 0,0127) ou OLA em associação com ALA (ANF+OLA+ALA: p = 0,0039) apresentaram aumento nos níveis de DOPAC em relação ao controle. Ao observar a razão DOPAC/DA, é possível perceber um aumento no grupo ANF em relação ao controle (p = 0,0022), apesar de nenhum dos tratamentos terem revertido este efeito.

Figura 12 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre o *turnover* de dopamina no hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.



(A) Níveis de dopamina (DA), (B) ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e (C) razão DOPAC/DA no hipocampo. Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8º e o 14º dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média \pm EPM ($n = 5-10$). Na figura, * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL). Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

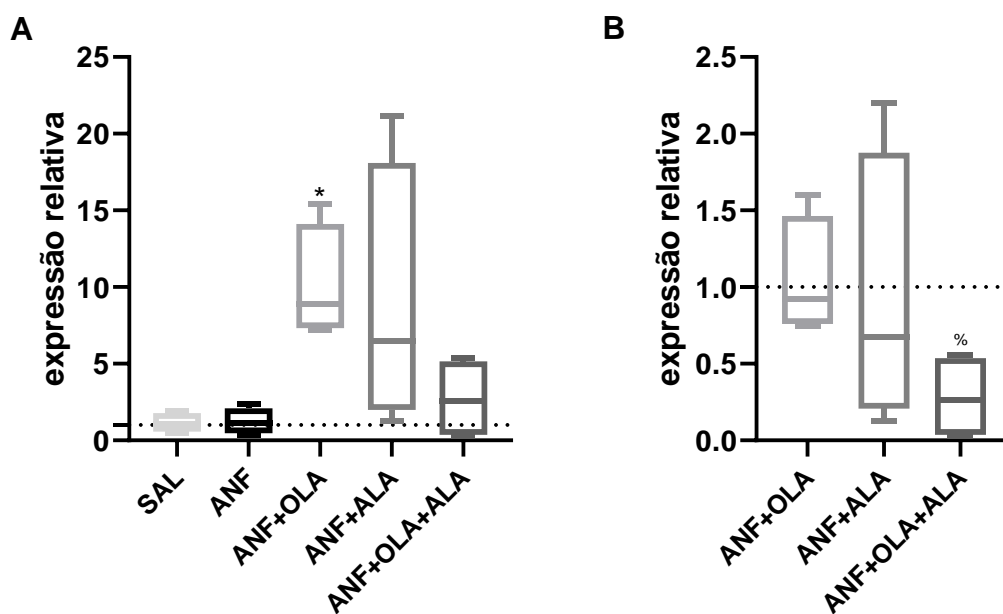
5.7 Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a expressão gênica dos receptores de dopamina D2 e D3 no corpo estriado de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina

Os níveis de expressão dos receptores dopaminérgicos D2 e D3 foram mensurados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. A partir destes dados, foi calculada a expressão gênica relativa ao grupo SAL e ao grupo OLA, de acordo com o método de Livak e Schmittgen (2001). Os resultados acima ou abaixo da linha tracejada em $y = 1$ indicam aumento ou diminuição, respectivamente, da expressão relativa ao grupo de referência.

Sobre a expressão gênica do receptor de dopamina D2, a análise variância demonstrou diferença significativa nos grupos com relação ao grupo SAL [$F(4, 16) = 4,186$; $P = 0,0165$] e com relação ao grupo OLA [$F(2, 8) = 5,020$; $P = 0,0387$]. Houve

aumento da expressão gênica relativa ao grupo SAL no grupo tratado com OLA (ANF+OLA: $p = 0,0316$). Considerando-se a expressão relativa ao grupo OLA, houve uma diminuição da expressão do receptor D2 no grupo tratado com OLA e ALA em associação (ANF+OLA+ALA: $p = 0,0297$).

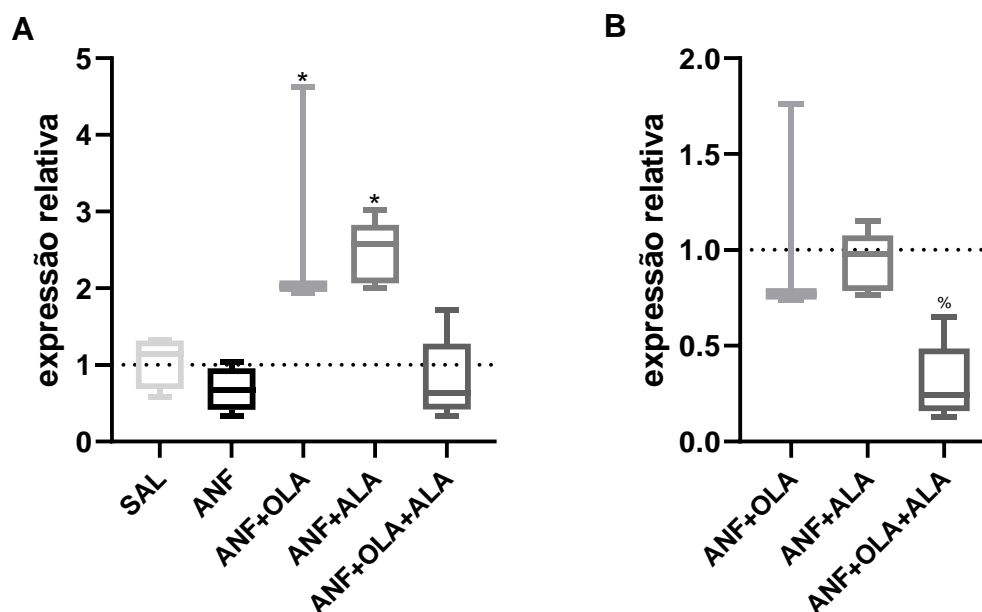
Figura 13 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a expressão gênica do receptor de dopamina D2 no corpo estriado de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.



(A) Níveis de expressão gênica de D2 relativa ao grupo SAL e (B) relativa ao grupo OLA. Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8^o e o 14^o dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média \pm EPM ($n = 4-5$). A linha tracejada em ($y = 1$) indica o nível normal de expressão do grupo de referência. Na figura, * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); % $P < 0,05$ quando comparado com o grupo OLA. Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

Considerando a expressão gênica do receptor D3, a análise variância demonstrou diferença significativa nos grupos com relação ao grupo SAL [$F(4, 16) = 9,105$; $P = 0,0005$] e com relação ao grupo OLA [$F(2, 10) = 7,998$; $P = 0,0084$]. Houve aumento da expressão gênica relativa ao grupo SAL no grupo tratado com OLA (ANF+OLA: $p = 0,0090$) e no grupo tratado com ALA (ANF+ALA: $p = 0,0195$). Na expressão gênica relativa ao grupo OLA, houve uma diminuição da expressão do receptor D3 no grupo tratado com OLA e ALA em associação (ANF+OLA+ALA: $p = 0,0102$).

Figura 14 – Efeitos da administração de ALA e OLA sobre a expressão gênica do receptor de dopamina D3 no corpo estriado de animais submetidos ao modelo de mania induzida por anfetamina.



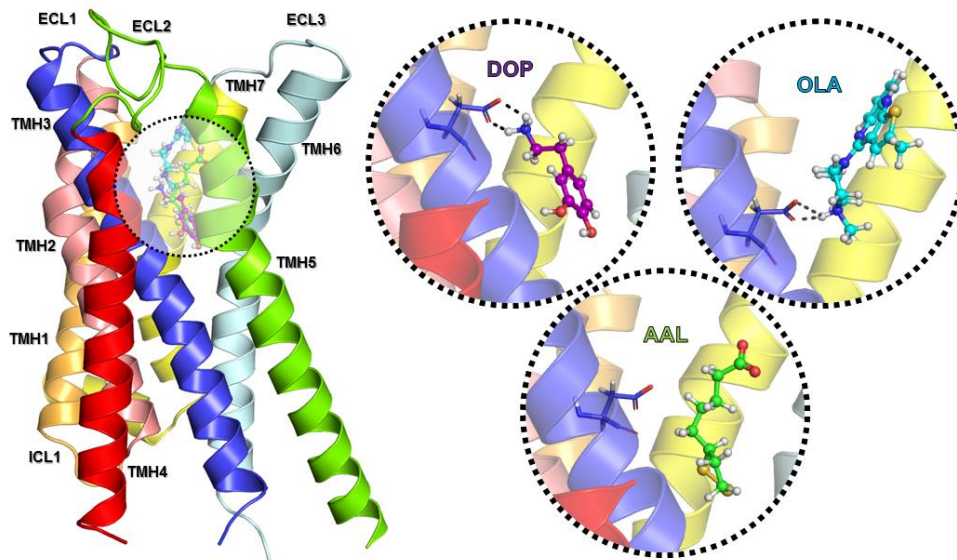
(A) Níveis de expressão gênica de D3 relativa ao grupo SAL e (B) relativa ao grupo OLA. Os animais receberam salina (i.p.) ou ANF (2 mg/kg, i.p.) durante 14 dias, sendo que entre o 8^o e o 14^o dia receberam, em adição, veículo (água), OLA (2 mg/kg, v.o.), ALA (100 mg/kg, v.o.) ou OLA e ALA em associação. Cada coluna representa a média ± EPM (n = 3-5). A linha tracejada em (y = 1) indica o nível normal de expressão do grupo de referência. Na figura, * P<0,05 quando comparado com o grupo controle (SAL); % P<0,05 quando comparado com o grupo OLA. Abreviações: ANF – anfetamina; OLA – olanzapina; ALA – ácido α -lipóico.

5.8 Estudo da interação de DA, ALA e OLA no sítio ortostérico dos receptores de dopamina D2 e D3

Com o objetivo de prever o local de interação da dopamina, ácido lipóico e olanzapina nos receptores de dopamina humanos D2 e D3 foi realizado o *docking* molecular através do *software* Autodock4.2.6 (HUEY; MORRIS, 2003), onde foram obtidas 500 poses para cada complexo receptor-ligante estudados. As poses obtidas foram agrupadas em clusters usando-se uma tolerância RMSD de 2,0 Å. Assim, a pose final para cada complexo foi selecionada considerando-se o *docking score*, o número de poses no *cluster* e a inspeção visual das estruturas.

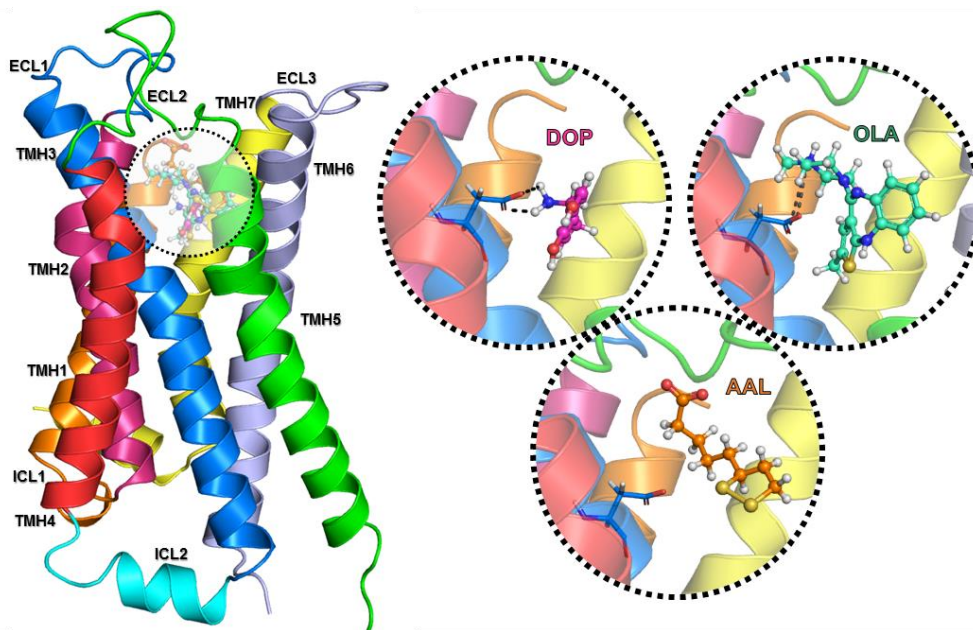
O resultado do *docking* pode ser observado nas Figuras 15 e 16 para o receptor D2 e D3, respectivamente, onde os ligantes foram sobrepostos, para fins de comparação, e mostrados separadamente com maior detalhe.

Figura 15 – Representação tridimensional dos complexos D2-DA, D2-ALA e D2-OLA resultantes de *docking* molecular.



O receptor D2R está representado em *cartoon*, mostrando as sete hélices transmembranares TMH1-7, três alças extracelulares ECL1-3 e uma alça intracelular ICL1, enquanto as moléculas dos ligantes estão representadas em bola e bastão. DA é visualizada em roxo, ALA em verde e OLA em ciano. Abreviações: DA – dopamina; ALA – ácido α -lipóico; OLA – olanzapina.

Figura 16 – Representação tridimensional dos complexos D3-DA, D3-ALA e D3-OLA resultantes de *docking* molecular.



O receptor D3R está representado em *cartoon*, mostrando as sete hélices transmembranares TMH1-7, três alças extracelulares ECL1-3 e duas alças intracelulares ICL1-2, enquanto as moléculas dos ligantes estão representadas em bola e bastão. DA é visualizada em magenta, ALA em laranja e OLA em verde ciano. Abreviações: DA – dopamina; ALA – ácido α -lipóico; OLA – olanzapina.

Para a análise a nível quântico da contribuição energética individual dos resíduos de aminoácido nos complexos receptor-ligante, foi traçado um raio de 5 Å a partir de cada um dos ligantes e os resíduos com pelo menos um átomo presente dentro deste raio foram considerados no estudo. Os resultados são expostos no formato painel BIRD (Figuras 17-22), incluindo todos os resíduos presentes dentro do raio de 5 Å em cada complexo. Estão indicados, para cada resíduo, a sua energia de interação individual com o ligante, a estrutura secundária do receptor da qual ele pertence e a sua distância para o ligante. Nas Figuras 23 e 24, podemos observar a energia total nas interações do D2 e D3, respectivamente, em função do raio de interação.

Considerando o raio de 5 Å, foram identificados 17 resíduos no sítio de interação de DA no receptor de dopamina humano D2 (Figura 17), distribuídos entre as hélices transmembranares 2, 3, 5, 6 e 7. A principal contribuição energética individual vem do resíduo Asp114 (-18,4 kcal/mol), localizado na TMH3, que responde sozinho por aproximadamente metade (48,16%) da energia total de interação do complexo. Quando consideramos as estruturas secundárias do receptor, a principal contribuição energética vem de TMH3 (-23,3 kcal/mol), seguido por TMH6 (-11,9 kcal/mol), TMH5 (-3,9 kcal/mol), TMH2 (0,2 kcal/mol) e TMH7 (0,7 kcal/mol). A energia total de interação, resultante dos 17 resíduos no raio de interação, foi de -38,2 kcal/mol.

Já no receptor D3, foram identificados 18 resíduos no sítio de interação de DA (Figura 18) distribuídos entre as hélices transmembranares 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e alça extracelular 2. A principal contribuição energética individual vem do resíduo Asp110 (-18,3 kcal/mol), localizado na TMH3, que representa aproximadamente metade (48,15%) da energia total de interação do complexo. Quando consideramos as estruturas secundárias do receptor, a principal contribuição energética vem de TMH3 (-22,2 kcal/mol), seguido por TMH6 (-9,9 kcal/mol), TMH5 (-3,2 kcal/mol), ECL2 (-1,9 kcal/mol), TMH7 (-0,5 kcal/mol), TMH4 (-0,2 kcal/mol) e TMH2 (-0,1 kcal/mol). A energia total de interação, resultante dos 18 resíduos, foi de -38,0 kcal/mol.

No sítio de interação de ALA no receptor D2 (Figura 19) foram identificados 17 resíduos no total, estando estes localizados nas hélices transmembranares 3, 5, 6 e 7. A principal contribuição energética individual vem do resíduo Ser193 (-11,3

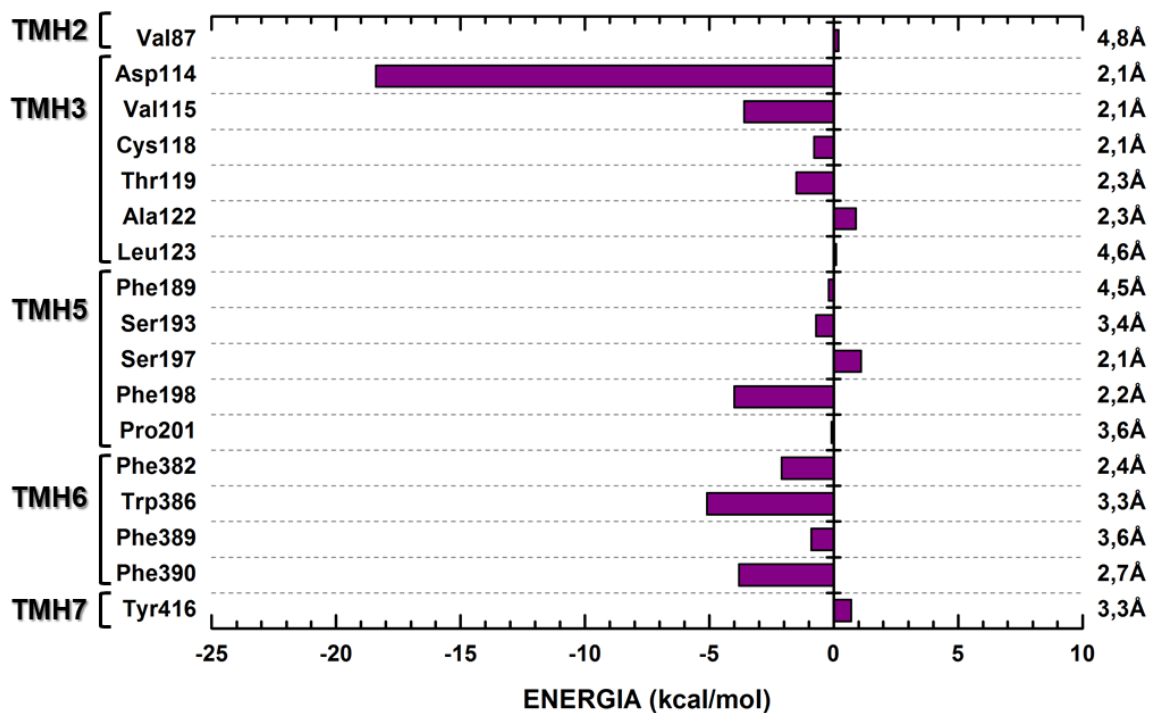
kcal/mol), localizado na TMH5. Considerando-se as estruturas secundárias do receptor, a principal contribuição energética vem de TMH5 (-18,9 kcal/mol), seguido por TMH6 (-15,2 kcal/mol), TMH7 (-0,3 kcal/mol) e TMH3 (0,9 kcal/mol), onde está localizado o resíduo Asp114 (4,5 kcal/mol), que apresentou importante energia repulsiva. A energia total de interação do sistema, resultante dos 17 resíduos no raio de interação, foi de -33,5 kcal/mol.

O sítio de interação de ALA no receptor D3 (Figura 20) compreendeu 20 resíduos, estando estes localizados nas hélices transmembranares 3, 5, 6 e 7 e alça extracelular 2. A principal contribuição energética individual vem do resíduo Ser182 (-15,0 kcal/mol), localizado na ECL2. Considerando-se as estruturas secundárias do receptor, a principal contribuição energética vem de ECL2 (-21,8 kcal/mol), seguido por TMH6 (-12,8 kcal/mol), TMH5 (-6,0 kcal/mol), TMH7 (-1,4 kcal/mol) e TMH3 (1,7 kcal/mol), onde está localizado o resíduo Asp110 (6,1 kcal/mol), com importante energia repulsiva. A energia total de interação do sistema, resultante dos 20 resíduos no raio de interação, foi de -40,3 kcal/mol.

Com relação à ligação de OLA no receptor D2 (Figura 21), foram identificados 20 resíduos no sítio de interação, localizados nas hélices transmembranares 3, 5, 6 e 7 e nas alças extracelulares 1 e 2. A principal contribuição energética individual neste sistema vem do resíduo Asp114 (-24,2 kcal/mol) da TMH3, que corresponde a aproximadamente um terço (31,06%) da energia total. Quando consideramos as estruturas secundárias do receptor, a principal contribuição energética vem de TMH3 (-31,3 kcal/mol), seguido por TMH6 (-17,6 kcal/mol), TMH7 (-13,0 kcal/mol), TMH5 (-11,5 kcal/mol), ECL2 (-2,3 kcal/mol) e ECL1 (-2,2 kcal/mol). O somatório da energia total de interação do sistema foi de -77,9 kcal/mol.

Já no receptor D3, o sítio de interação de OLA é composto por 28 resíduos (Figura 22), distribuídos entre as hélices transmembranares 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e a alça extracelular 2. A principal contribuição energética individual neste sistema vem do resíduo Asp110 (-11,1 kcal/mol), na TMH3. Quando consideramos as estruturas secundárias do receptor, a principal contribuição energética vem de TMH3 (-21,7 kcal/mol), seguido por TMH6 (-18,2 kcal/mol), TMH5 (-13,0 kcal/mol), TMH7 (-2,5 kcal/mol), TMH2 (-2,1 kcal/mol), ECL2 (-0,6 kcal/mol) e TMH4 (-0,4 kcal/mol). O somatório da energia total de interação do sistema foi de -58,5 kcal/mol.

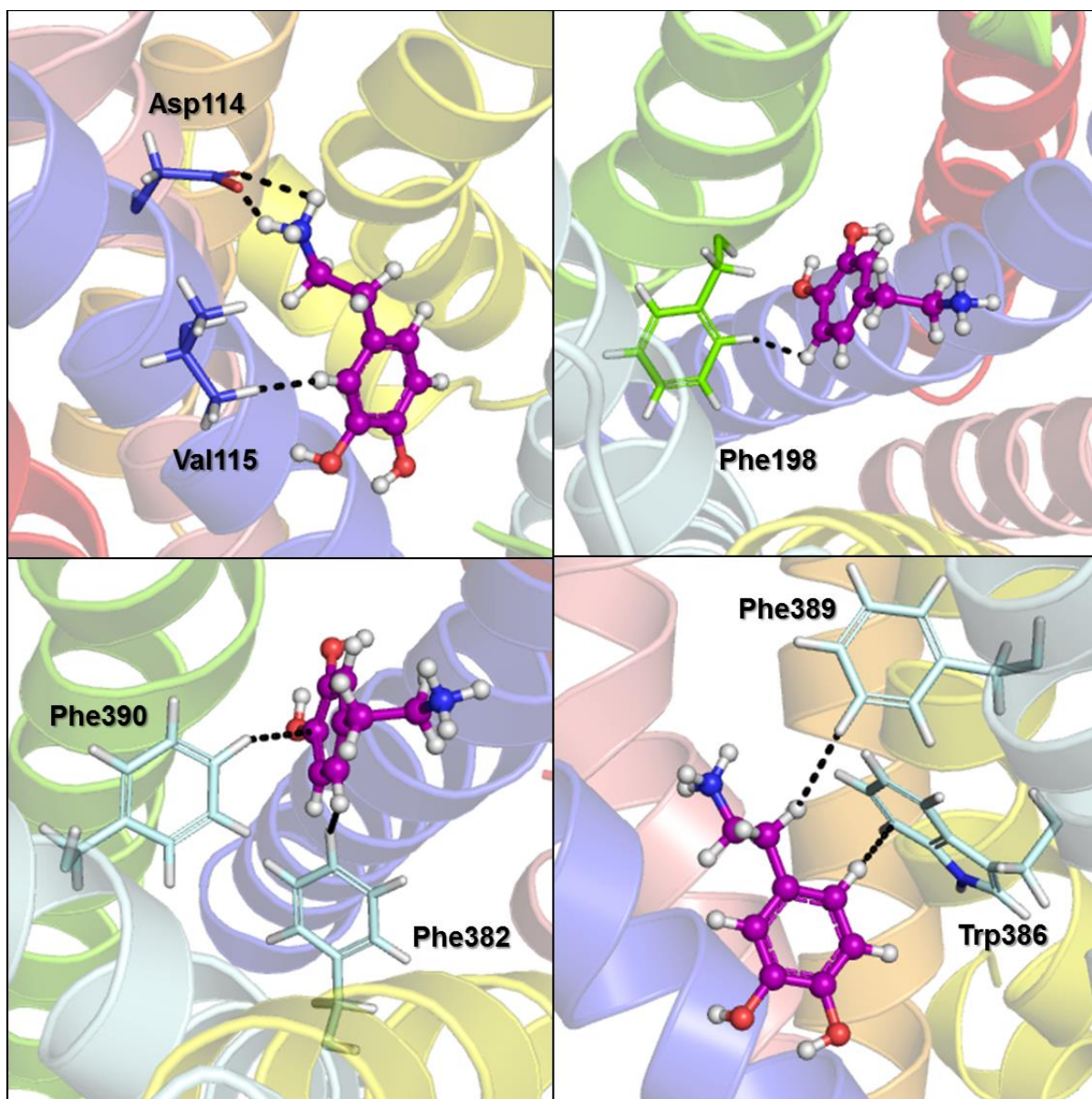
Figura 17 – Perfil de interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D2 representado no painel BIRD.



Energias Parciais			ENERGIA TOTAL
TMH2: 0,2 kcal/mol	TMH3: -23,3 kcal/mol	TMH5: -3,9 kcal/mol	E(5Å): -38,2 kcal/mol
TMH6: -11,9 kcal/mol	TMH7: 0,7 kcal/mol	-	

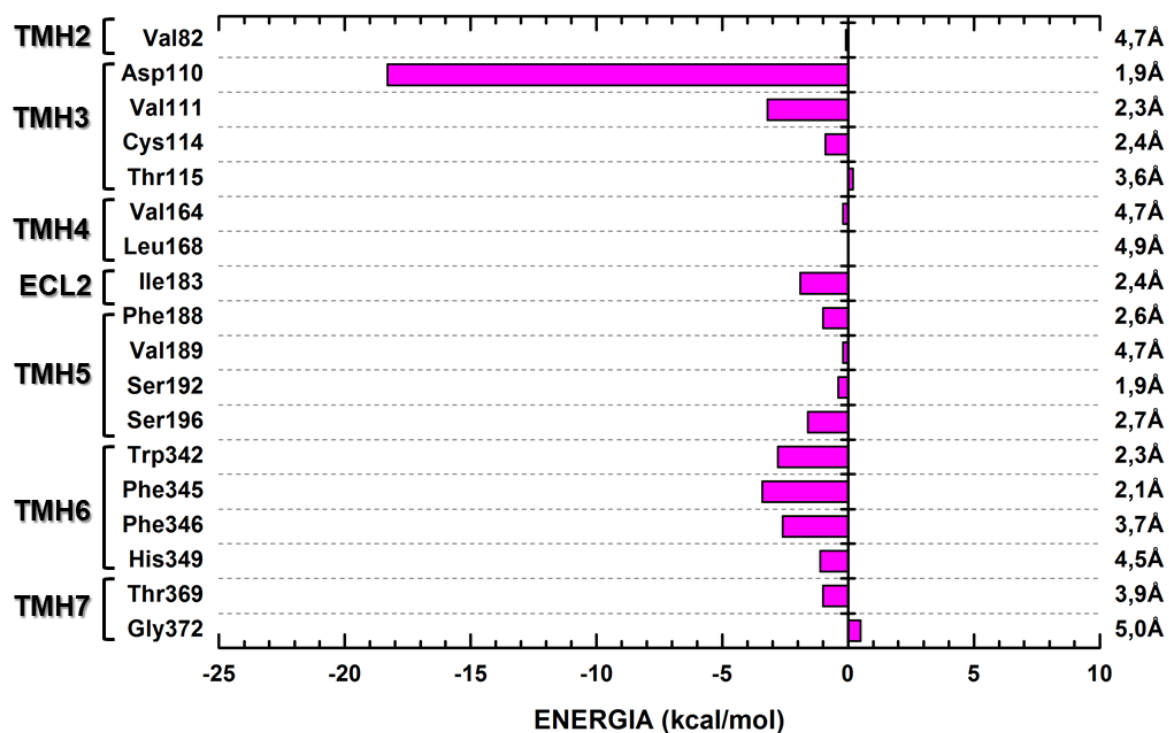
As energias de interação dos resíduos com a DA são representadas pelas barras. À esquerda, estão indicados o resíduo de aminoácido e a estrutura secundária do receptor em que eles estão localizados. À direita, está indicada a distância mínima entre o resíduo e o ligante. Abaixo, estão discriminadas as energias de interação de cada região do receptor, resultante da soma das energias individuais dos resíduos naquela região, e a energia total de interação do complexo D2-DA.

Figura 18 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D2.



Fonte: Elaborado pela autora.

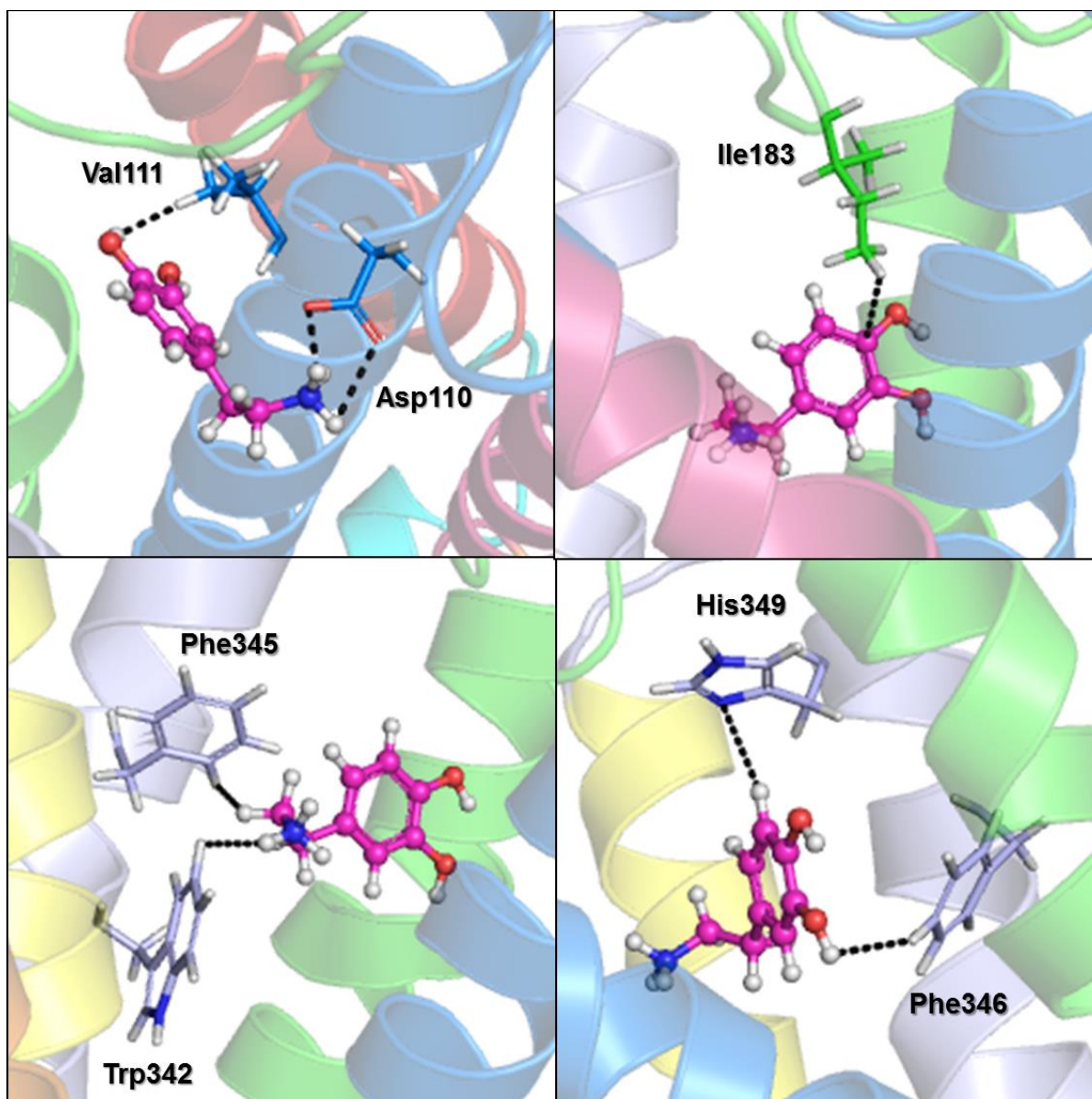
Figura 19 – Perfil de interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D3 representado no painel BIRD.



Energias Parciais			ENERGIA TOTAL
TMH2: -0,1 kcal/mol	TMH3: -22,2 kcal/mol	TMH4: -0,2 kcal/mol	E(5Å): -38,0 kcal/mol
ECL2: -1,9 kcal/mol	TMH5: -3,2 kcal/mol	TMH6: -9,9 kcal/mol	
TMH7: -0,5 kcal/mol	-	-	

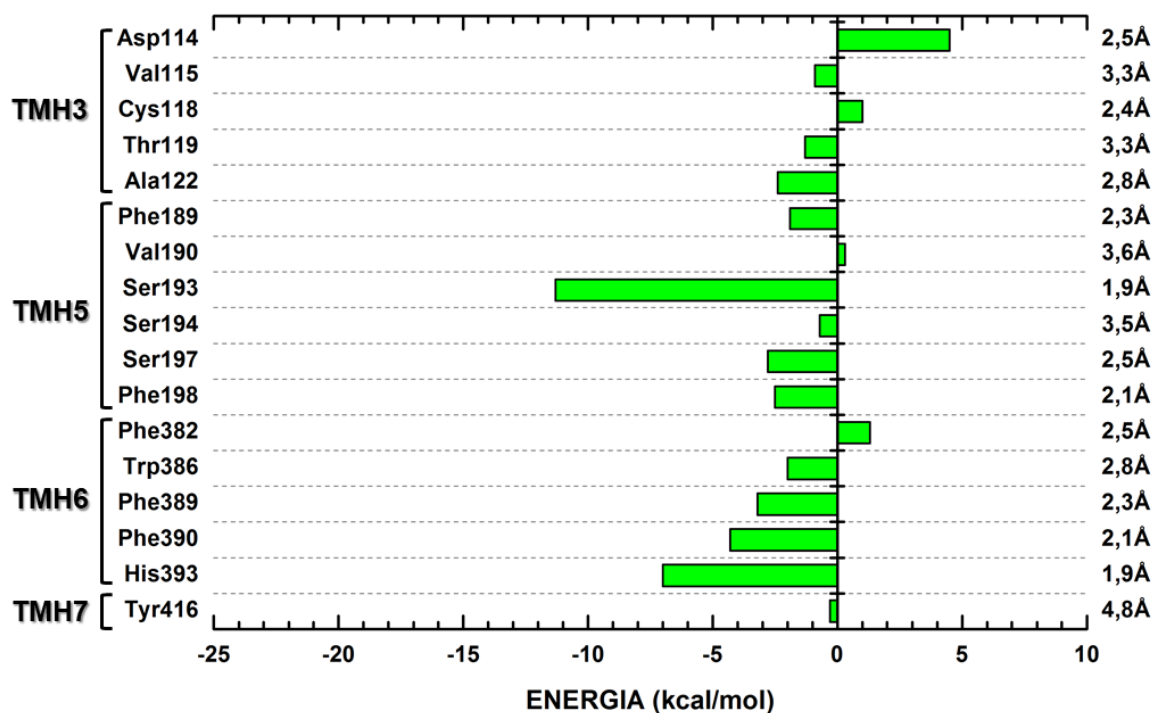
As energias de interação dos resíduos com a DA são representadas pelas barras. À esquerda, estão indicados o resíduo de aminoácido e a estrutura secundária do receptor em que eles estão localizados. À direita, está indicada a distância mínima entre o resíduo e o ligante. Abaixo, estão discriminadas as energias de interação de cada região do receptor, resultante da soma das energias individuais dos resíduos naquela região, e a energia total de interação do complexo D3-DA.

Figura 20 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre a dopamina e o receptor dopaminérgico D3.



Fonte: Elaborado pela autora.

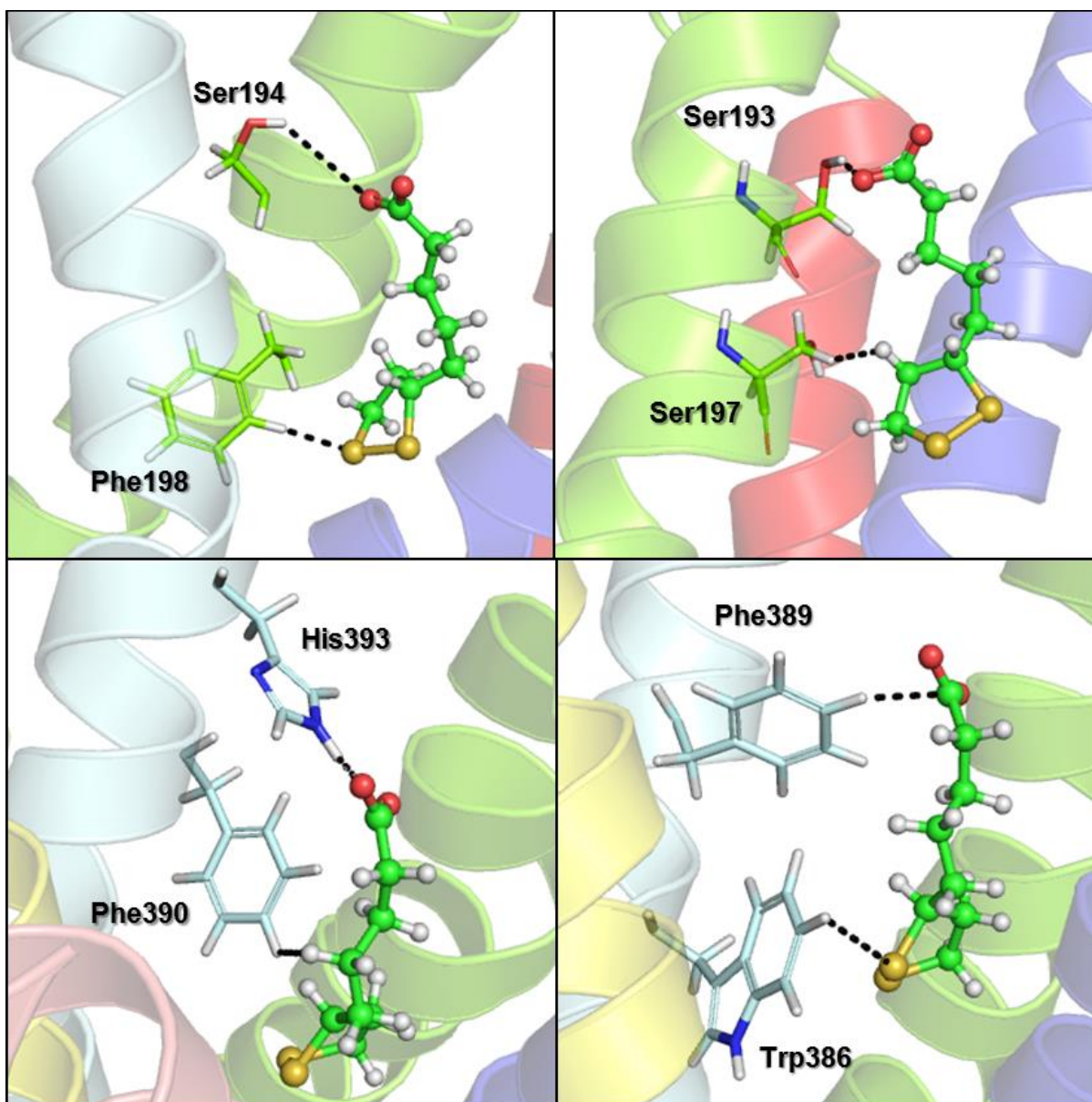
Figura 21 – Perfil de interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D2 representado no painel BIRD.



Energias Parciais			ENERGIA TOTAL
TMH3: 0,9 kcal/mol	TMH5: -18,9 kcal/mol	TMH6: -15,2 kcal/mol	E(5Å): -33,5 kcal/mol
TMH7: -0,3 kcal/mol	-	-	

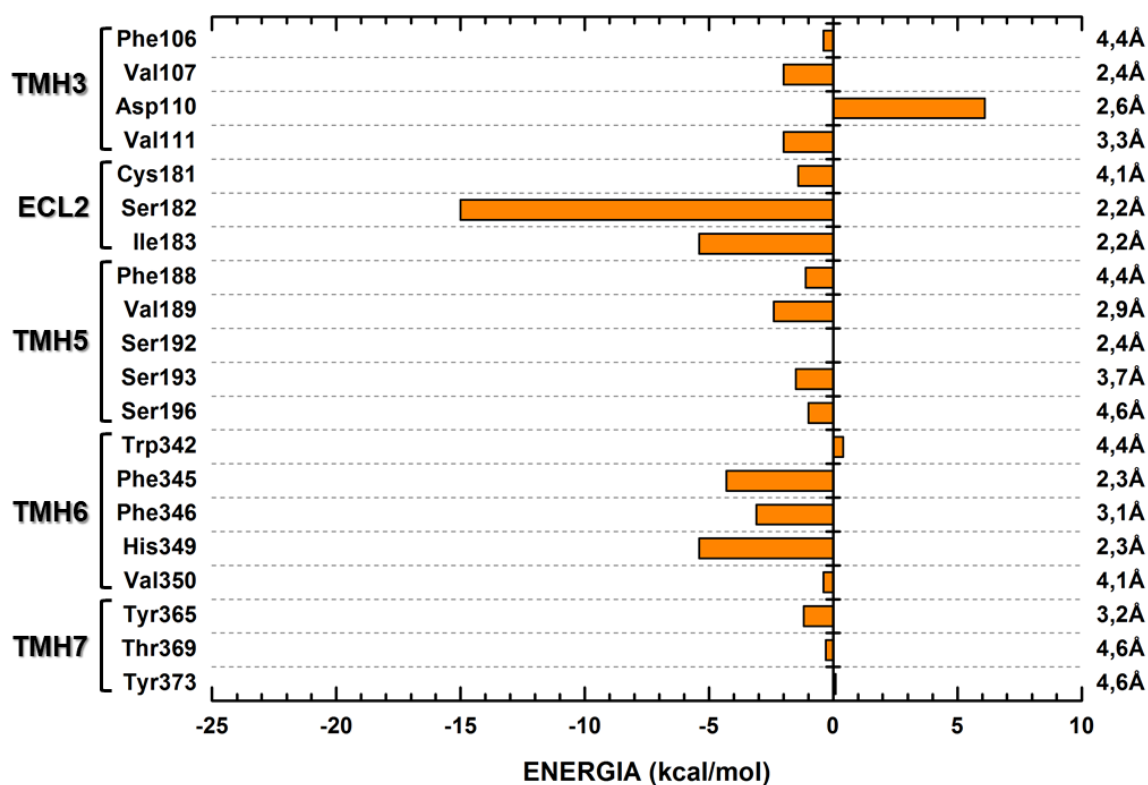
As energias de interação dos resíduos com o ALA são representadas pelas barras. À esquerda, estão indicados o resíduo de aminoácido e a estrutura secundária do receptor em que eles estão localizados. À direita, está indicada a distância mínima entre o resíduo e o ligante. Abaixo, estão discriminadas as energias de interação de cada região do receptor, resultante da soma das energias individuais dos resíduos naquela região, e a energia total de interação do complexo D2-ALL.

Figura 22 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D2.



Fonte: Elaborado pela autora.

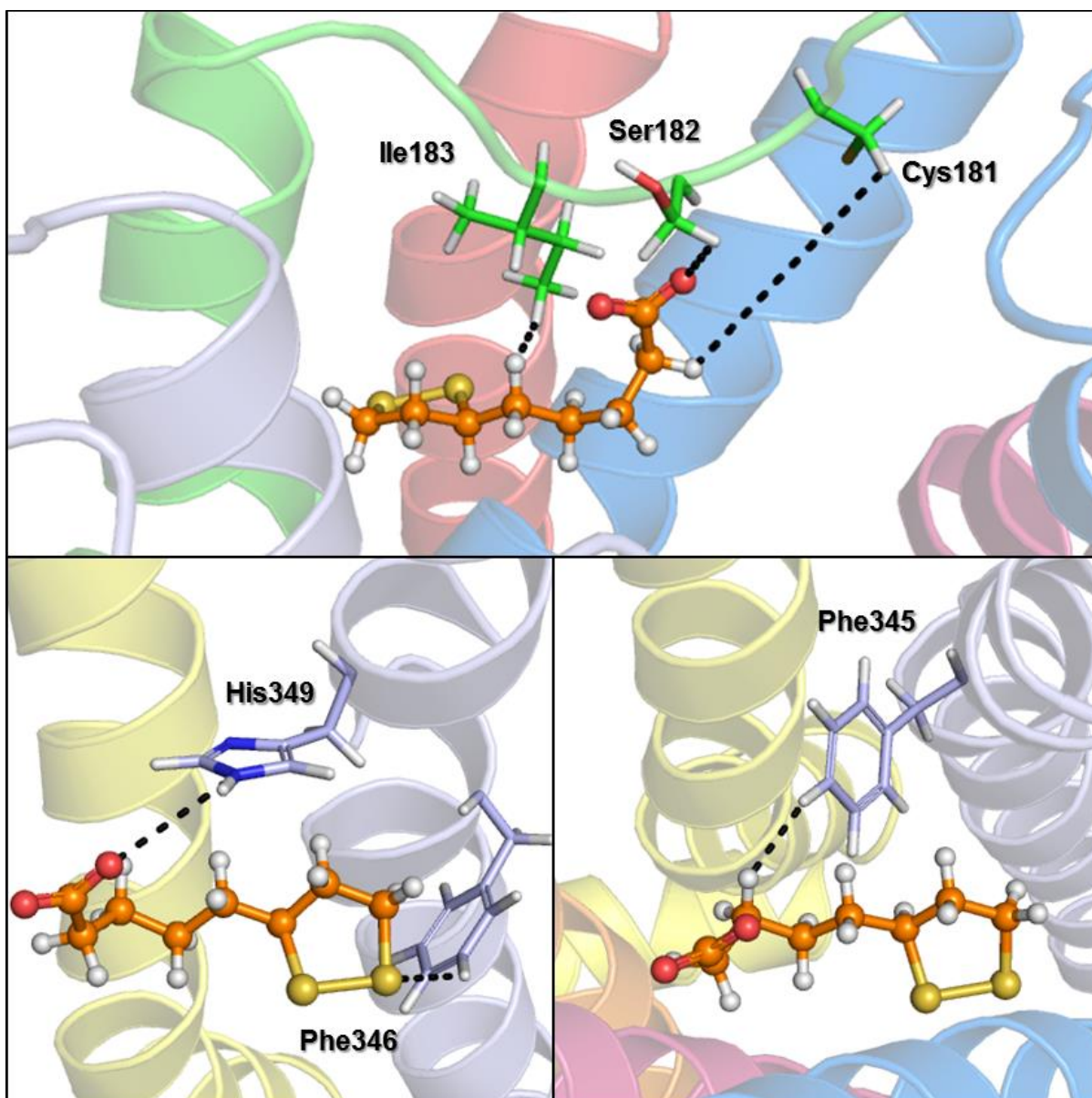
Figura 23 – Perfil de interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D3 representado no painel BIRD.



Energias Parciais			ENERGIA TOTAL
TMH3: 1,7 kcal/mol	ECL2: -21,8 kcal/mol	TMH5: -6,0 kcal/mol	E(5Å): -40,3 kcal/mol
TMH6: -12,8 kcal/mol	TMH7: -1,4 kcal/mol	-	

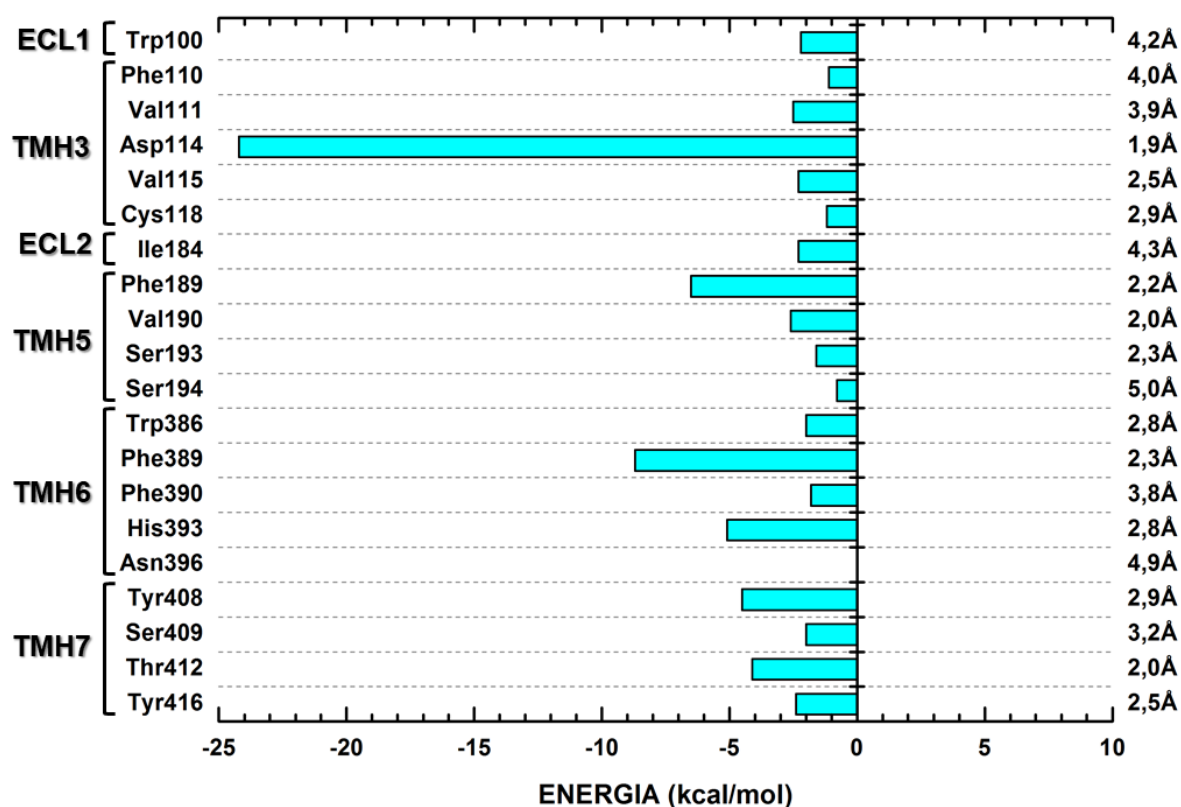
As energias de interação dos resíduos com o ALA são representadas pelas barras. À esquerda, estão indicados o resíduo de aminoácido e a estrutura secundária do receptor em que eles estão localizados. À direita, está indicada a distância mínima entre o resíduo e o ligante. Abaixo, estão discriminadas as energias de interação de cada região do receptor, resultante da soma das energias individuais dos resíduos naquela região, e a energia total de interação do complexo D3-ALA.

Figura 24 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre o ácido α -lipóico e o receptor dopaminérgico D3.



Fonte: Elaborado pela autora.

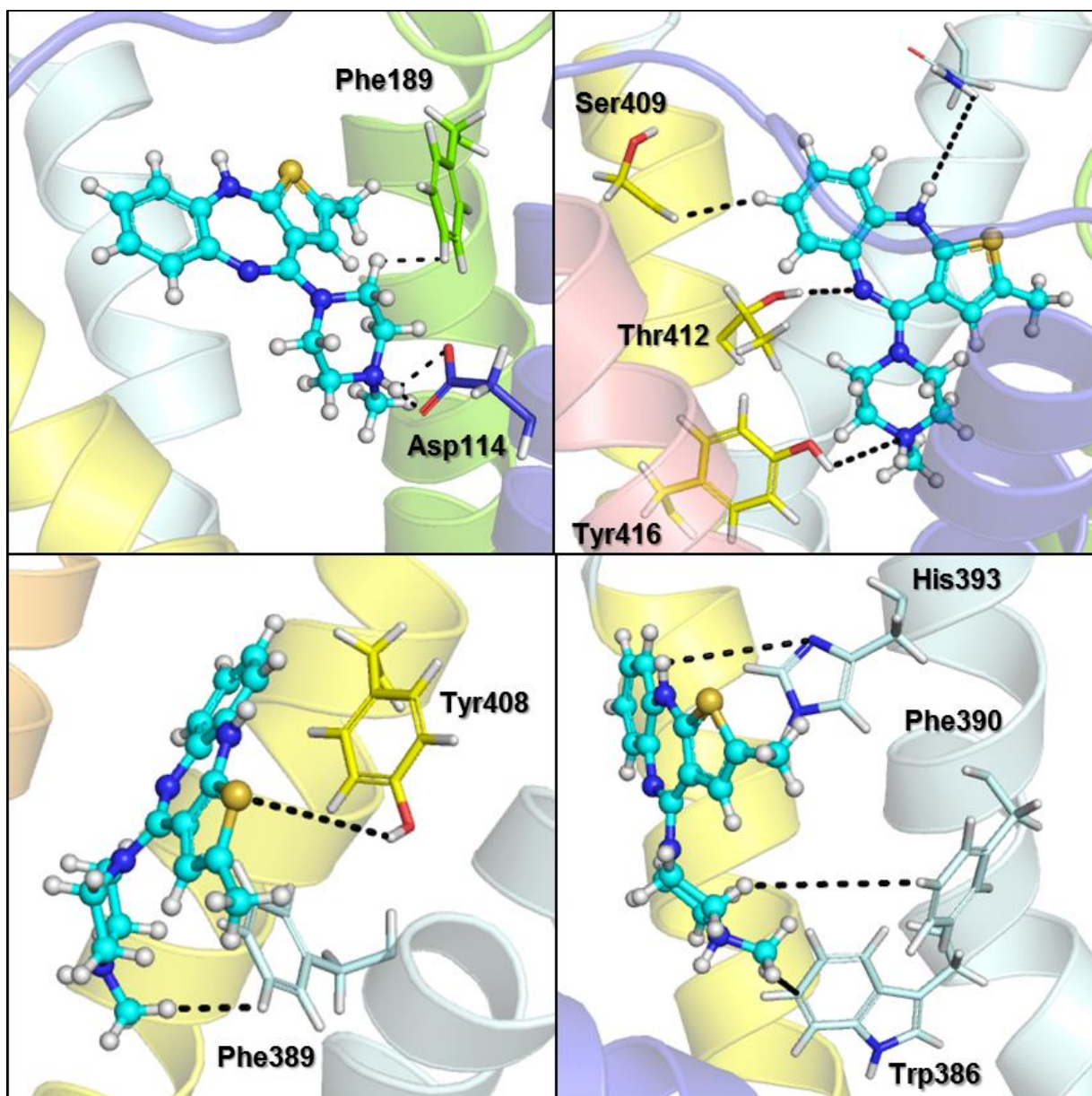
Figura 25 – Perfil de interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D2 representado no painel BIRD.



Energias Parciais			ENERGIA TOTAL
ECL1: -2,2 kcal/mol	TMH3: -31,3 kcal/mol	ECL2: -2,3 kcal/mol	E(5Å): -77,9 kcal/mol
TMH5: -11,5 kcal/mol	TMH6: -17,6 kcal/mol	TMH7: -13,0 kcal/mol	

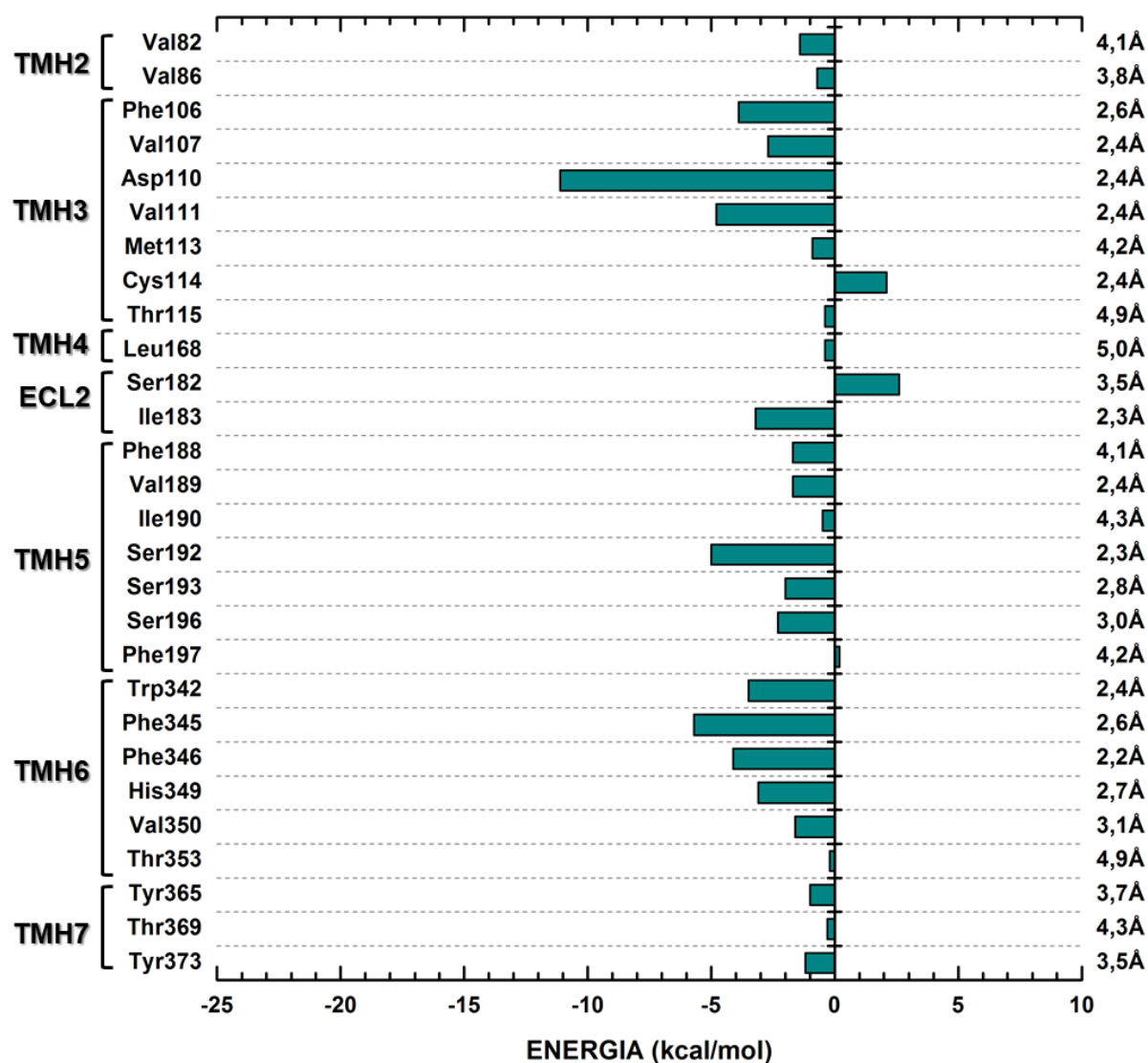
As energias de interação dos resíduos com a OLA são representadas pelas barras. À esquerda, estão indicados o resíduo de aminoácido e a estrutura secundária do receptor em que eles estão localizados. À direita, está indicada a distância mínima entre o resíduo e o ligante. Abaixo, estão discriminadas as energias de interação de cada região do receptor, resultante da soma das energias individuais dos resíduos naquela região, e a energia total de interação do complexo D2-OLA.

Figura 26 – Representação espacial dos resíduos de maior energia na interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D2.



Fonte: Elaborado pela autora.

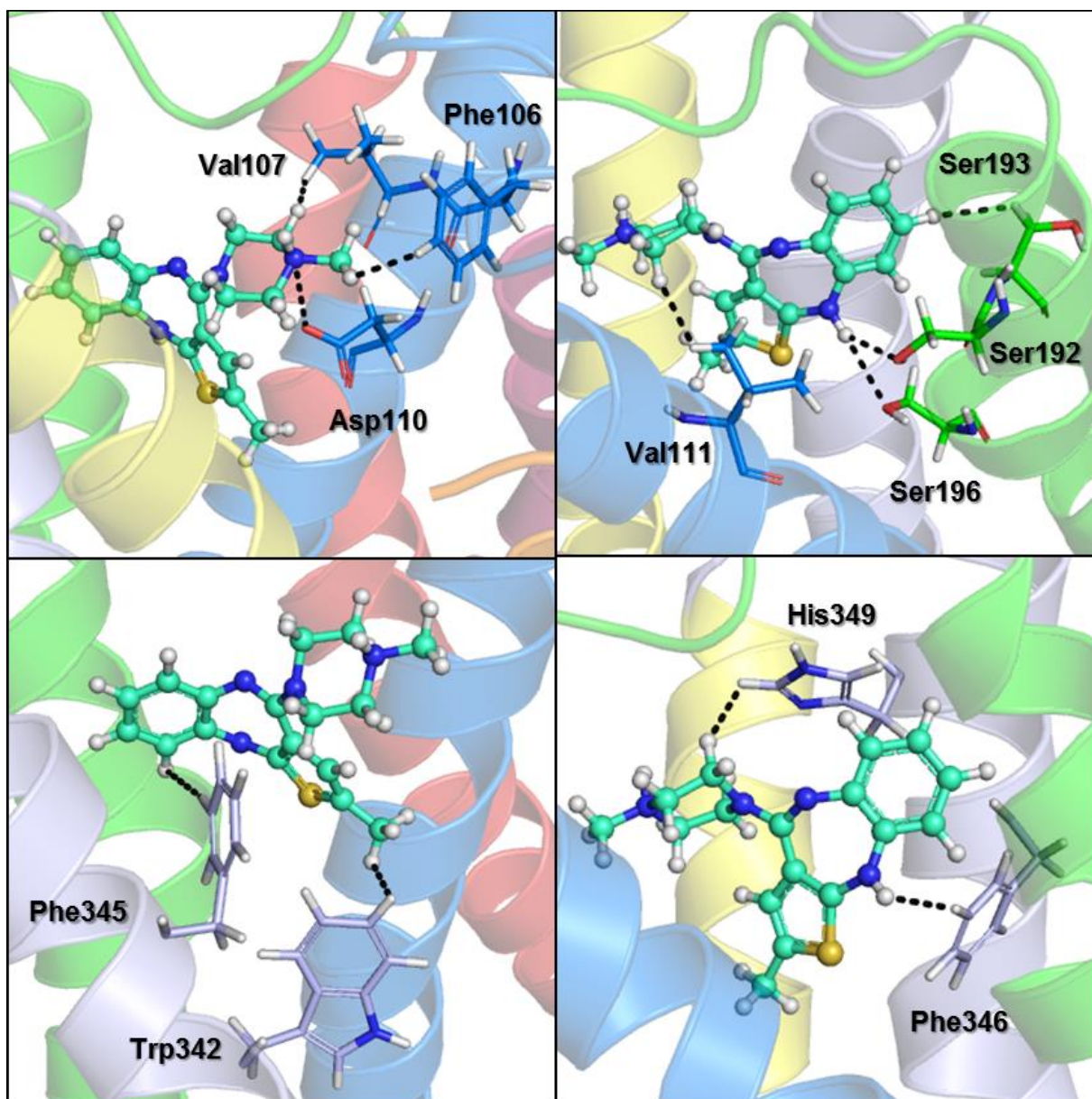
Figura 27 – Perfil de interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D3 representado no painel BIRD.



Energias Parciais			ENERGIA TOTAL
TMH2: -2,1 kcal/mol	TMH3: -21,7 kcal/mol	TMH4: -0,4 kcal/mol	E(5Å): -58,5 kcal/mol
ECL2: -0,6 kcal/mol	TMH5: -13,0 kcal/mol	TMH6: -18,2 kcal/mol	
TMH7: -2,5 kcal/mol	-	-	

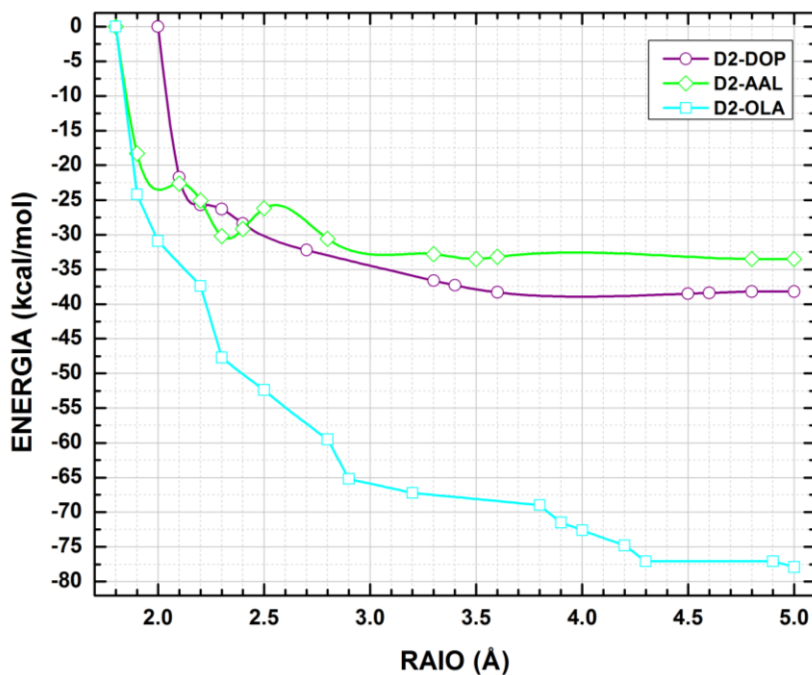
As energias de interação dos resíduos com a OLA são representadas pelas barras. À esquerda, estão indicados o resíduo de aminoácido e a estrutura secundária do receptor em que eles estão localizados. À direita, está indicada a distância mínima entre o resíduo e o ligante. Abaixo, estão discriminadas as energias de interação de cada região do receptor, resultante da soma das energias individuais dos resíduos naquela região, e a energia total de interação do complexo D3-OLA.

Figura 28 – Representação espacial dos de maior energia na interação entre a olanzapina e o receptor dopaminérgico D3.



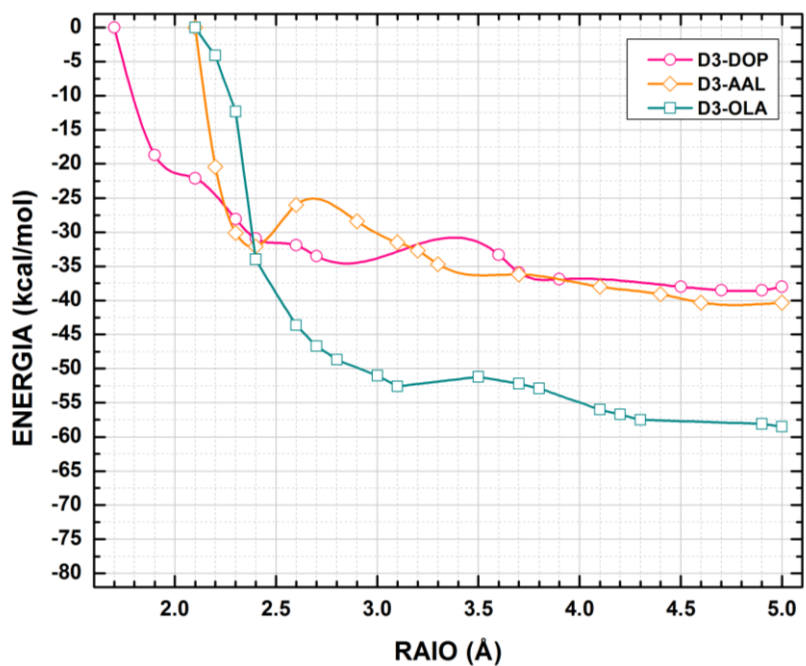
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 29 – Energia total em função do raio interação dos complexos D2-DA, D2-ALA e D2-OLA analisado por bioquímica quântica.



A curva em roxo representa o complexo D2-DA, em verde representa o complexo D2-ALA e em ciano representa o complexo D2-OLA.

Figura 30 – Energia total em função do raio interação dos complexos D3-DA, D3-ALA e D3-OLA analisado por bioquímica quântica.



A curva em magenta representa o complexo D3-DA, em laranja representa o complexo D3-ALA e em verde ciano representa o complexo D3-OLA.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração de ALA em associação com OLA em camundongos fêmeas submetidos ao modelo de mania induzido por ANF foi efetiva na prevenção do ganho de peso causado pelo tratamento com OLA nestes camundongos. Além disso, este estudo demonstrou a reversão da hiperlocomoção e comportamento exploratório no campo aberto induzidos pela administração crônica de ANF através dos tratamentos com OLA, ALA ou as duas drogas combinadas, e reversão do comportamento de risco induzido por ANF no labirinto em cruz elevado através da administração de ALA sozinho (nos parâmetros de tempo de permanência nos braços abertos ou número de mergulhos) ou combinado com OLA (apenas no número de mergulhos). A administração crônica de ANF não causou alterações na sociabilidade e memória de trabalho destes animais.

A análise neuroquímica revelou um aumento na razão DOPAC/DA no hipocampo no grupo ANF em comparação ao controle. No corpo estriado, observamos um aumento da expressão do receptor D2 induzido por OLA, que foi revertido no tratamento com OLA e ALA em associação, e aumento da expressão do receptor D3 induzido por OLA ou ALA, também revertido no tratamento com as duas drogas em associação. Por fim, o estudo computacional revelou uma possível interação do ALA no sítio ortostérico dos receptores de dopamina D2 e D3, através de um padrão diferente daquele observado para a DA, o ligante endógeno, ou para a OLA, um antipsicótico de segunda geração.

Efeitos da administração de ALA, sozinho ou em associação com OLA, sobre o peso corporal de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por ANF.

O transtorno afetivo bipolar é uma doença neuropsiquiátrica complexa que envolve múltiplos fatores. A recorrência de episódios de mania e depressão tem sido associada a perda neuronal progressiva e aumento da frequência e severidade das crises subsequentes (MUNEER, 2016; SCAINI *et al.*, 2020). De acordo com MUNEER (2016), a doença evolui até um estágio final de persistência dos sintomas onde não é mais possível alcançar uma remissão. O componente oxidativo da doença é especialmente importante nesta progressão, gerando efeitos que repercutem além do sistema nervoso central (SCAINI *et al.*, 2020). Assim, o TAB apresenta importante

comorbidade com distúrbios metabólicos e cardiovasculares decorrentes dos efeitos periféricos da doença, sendo que os pacientes tem risco aumentado de mortalidade por estas condições clínicas secundárias (SCAINI *et al.*, 2020).

Como discutido anteriormente, o tratamento farmacológico do TAB ainda tem eficácia limitada em estabilizar a doença a longo prazo, além de apresentar muitos efeitos colaterais associados. Os antipsicóticos de segunda geração, como a olanzapina, utilizados no tratamento agudo da mania e manutenção, tem menor potencial de indução de sintomas extrapiramidais em relação aos clássicos, porém apresentam alto potencial de indução de ganho de peso significativo durante o tratamento e síndrome metabólica. Nosso estudo corrobora os dados encontrados na literatura ao reportar o aumento de peso induzido pela OLA em camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por ANF. Os efeitos colaterais destes antipsicóticos podem ter graves consequências como aumento da incidência de alterações metabólicas e comprometimento da adesão dos pacientes ao tratamento (DAYABANDARA *et al.*, 2017), tornando evidente a necessidade da busca de novas terapêuticas para o transtorno bipolar.

Tendo em vista o importante componente oxidativo associado a fisiopatologia do TAB, sua comorbidade com distúrbios cardiometabólicos e a problemática do seu tratamento, um crescente número de evidências tem apontado os benefícios do ALA, um potente antioxidante, como adjuvante no tratamento deste distúrbio. Um estudo clínico prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou a melhora dos sintomas positivos, negativos e cognitivos e redução significativa de sintomas extrapiramidais em pacientes esquizofrênicos em tratamento com antipsicóticos através da adição do ALA na dose de 100 mg/dia à terapia em curso durante 4 meses (SANDERS *et al.*, 2017). Além disso, é sabido que o ácido lipóico pode prevenir síndrome metabólica, aumentar a sensibilidade à insulina e reduzir a sensação de fome, auxiliando na perda de peso (PACKER *et al.*, 2001; ZIEGLER, 2004).

O presente estudo mostrou que o tratamento com ALA em associação a OLA foi capaz de prevenir o aumento de peso causado pela OLA em camundongos fêmeas submetidos ao modelo de mania induzido por ANF. Estes resultados tem extrema importância na clínica, visto que o ganho de peso associado aos antipsicóticos limita a adesão dos pacientes ao tratamento e aumenta o risco de desenvolvimento de

condições clínicas secundárias, e dão suporte ao uso do ALA como adjuvante no tratamento da mania com antipsicóticos a fim de prevenir os efeitos colaterais associados. Ainda, a reprodução dos efeitos de ALA e OLA sobre o peso no modelo animal de mania pode ser útil na investigação dos mecanismos moleculares envolvidos nesta regulação.

Efeitos da administração de ALA, sozinho ou em associação com OLA, sobre as alterações comportamentais de camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por ANF.

A reprodução das características do TAB em modelos animais representa um desafio no estudo deste distúrbio, tendo em vista sua alta complexidade. O modelo de mania induzido por ANF, assim como a maioria dos modelos de mania (LOGAN; MCCLUNG, 2016), baseia-se na hiperlocomoção causada pelo aumento da liberação de dopamina no cérebro, sendo a observação deste fenótipo utilizada como o principal critério de avaliação dos modelos (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). Este comportamento é análogo ao sintoma de agitação psicomotora observado no quadro clínico de mania e que faz parte dos critérios diagnósticos do TAB de acordo com DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Com relação à atividade locomotora e exploratória dos animais, nossos resultados demonstraram um aumento no número de cruzamentos decorrente da administração de ANF, que foi revertido por todos os tratamentos testados. Este achado é consistente com resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, que demonstram a reversão da hiperlocomoção induzida por anfetamina através da administração de ALA nas doses de 50 ou 100 mg/kg em camundongos machos (MACÊDO *et al.*, 2012). De modo similar, outro estudo demonstrou que o ALA (100 mg/kg) sozinho ou combinado com clozapina (2,5 ou 5 mg/kg) foi capaz de reverter o aumento no número de *crossings* e de *rearings* causado pela administração crônica de cetamina em camundongos machos (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Nas condições experimentais deste estudo, não foi possível observar diferenças significativas em relação ao número de *rearings* ou de *groomings* do grupo ANF em relação ao grupo controle. Curiosamente, Macedo e colaboradores (MACÊDO *et al.*, 2012) demonstraram um aumento no número de *rearings* induzido pela administração crônica de anfetamina em camundongos machos, efeito revertido

por ALA 100 mg/kg. Acreditamos que estas diferenças podem estar relacionadas ao sexo, já que os animais utilizados neste estudo eram fêmeas. Outro ponto que vale salientar é que o estudo em questão utilizou animais convencionais, enquanto nós utilizamos animais SPF.

Interessantemente, os animais tratados com ALA e OLA em associação apresentaram uma diminuição do número de *groomings* em relação ao controle. É sabido que a dopamina tem um papel crítico na função locomotora, inclusive para os movimentos de *grooming* e outros padrões complexos de comportamento (BERRIDGE *et al.*, 2005; CROMWELL; BERRIDGE, 1996). Kalueff e colaboradores (KALUEFF *et al.*, 2015) discutem que o comportamento de *grooming* pode ser afetado por lesões nigroestriatais e pela administração de diversas drogas com ação dopaminérgica. Estes autores ressaltam a importância do equilíbrio do sistema dopaminérgico no estriado para a regulação do comportamento de *grooming*. Assim, a diminuição do *grooming* causada pela associação das duas drogas pode estar relacionada a um desbalanço dopaminérgico, já que ambas as drogas atuam neste sistema.

Como discutido acima, a hiperatividade é a principal característica fenotípica capturada pelos modelos animais de mania. De fato, pacientes em quadros agudos de mania apresentam esta característica (MINASSIAN *et al.*, 2011; PERRY *et al.*, 2010). Porém, esta é apenas uma faceta dentre diversos outros sintomas que compõem o quadro maníaco (LOGAN; MCCLUNG, 2016). Para além desta característica, acredita-se que a observação de comportamento estereotipado, níveis de ansiedade diminuídos, comportamentos de risco e impulsividade nos modelos animais podem refletir fenótipos observados em distúrbios psiquiátricos, como a esquizofrenia e o TAB (VAN DEN BUUSE, 2009; WALTERS *et al.*, 2008; ZHUANG *et al.*, 2001). Portanto, a avaliação destes comportamentos nos modelos pré-clínicos de mania deve ser estimulada.

Na análise comportamental de roedores, a ansiedade pode ser avaliada através da exposição a condições ambientais aversivas. Sabe-se que estes animais apresentam uma tendência natural de aversão à espaços abertos, já que os ambientes fechados e escuros promovem uma maior sensação de segurança (SESTAKOVA *et al.*, 2013). No teste de campo aberto, geralmente observa-se uma

preferência a permanecer próximo às paredes do aparato e evitar o quadrante central, de modo que o comportamento relacionado à ansiedade pode ser medido pelo grau em que os animais evitam o centro. O aumento da atividade central indica alto comportamento exploratório e baixos níveis de ansiedade, que por sua vez pode ser interpretado como comportamento de risco (ZHOU *et al.*, 2015).

Os resultados deste experimento mostram um aumento no tempo de permanência no centro do aparato no campo aberto induzido pela administração crônica de anfetamina, revelando um aumento do comportamento exploratório dos animais e diminuição dos níveis de ansiedade. Assim como o número de cruzamentos, o aumento da atividade central induzido pela ANF foi revertido por todos os tratamentos testados.

De modo similar, a aversão pelos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado fornece uma medida de ansiedade em roedores (TRULLAS; SKOLNICK, 1993). O aumento da atividade nos braços abertos implica em diminuição dos níveis de ansiedade e, assim como o aumento do tempo de permanência no centro no campo aberto, pode ser considerado um comportamento de risco. Corroborando o que foi observado com relação à atividade central no teste de campo aberto, observamos que os animais tratados com ANF apresentaram um aumento no tempo de permanência nos braços abertos. Este resultado foi confirmado, também, pelo aumento no número de mergulhos nos braços abertos, neste mesmo teste. Este achados sugerem que estes comportamentos estejam relacionados ao risco, além do aumento da atividade exploratória, e estão em concordância com os dados disponíveis na literatura no modelo de mania induzida por anfetamina (ZHOU *et al.*, 2015) e em outros modelos de mania (ACKERMANN *et al.*, 2010; KEERS *et al.*, 2012; LOPACHEV *et al.*, 2019).

No presente estudo, apenas o tratamento com ALA sozinho foi capaz de reverter o aumento no tempo de permanência nos braços abertos causado pela ANF no teste de labirinto em cruz elevado, enquanto que tanto o tratamento com ALA sozinho quanto em associação com OLA revertem o aumento no número de *head dips* neste mesmo teste. Este padrão de comportamento nos animais pode ser correlacionado com a característica de envolvimento em atividades de risco e impulsividade observada em pacientes com mania (PERRY *et al.*, 2009, 2010), o que

geralmente está associado com as altas taxas de suicídio (JOHNSON; CARVER; THARP, 2017).

Durante os episódios de mania, os pacientes com TAB encontram-se mais propícios a comportamentos de tomada de risco, o que pode estar associado a um aumento dos contatos sociais. Nestes períodos, o paciente se encontra com alta expressão da fala e de busca de contato, comportamento que pode ser avaliado em modelos animais de mania (MANDUCA *et al.*, 2016). Entretanto, a administração crônica de anfetamina não causou alterações na sociabilidade dos animais neste estudo.

Pacientes afetados pelo TAB frequentemente apresentam comprometimento cognitivo (SAITO *et al.*, 2017). Um estudo prévio realizado por Gomes e colaboradores (GOMES *et al.*, 2015) demonstrou o déficit cognitivo causado pela administração crônica de anfetamina em camundongos machos. Assim, nosso estudo propôs avaliar os efeitos da administração crônica de ANF na memória de trabalho dos animais através do teste de labirinto em Y. Curiosamente, não foram observadas diferenças significativas quanto à memória de trabalho de camundongos fêmeas submetidos ao modelo de mania induzido por ANF no presente estudo, o que pode ser um efeito relacionado ao sexo. De fato, DAO *et al.* (2010) reportam a influência de genes relacionados ao sexo no fenótipo observado no TAB e em modelos pré-clínicos.

Ainda no teste de labirinto em Y, foi observado um aumento no número de alternâncias total no grupo ANF, revertido pelos tratamentos com ALA sozinho ou associado a OLA. Este achado corrobora a observação da hiperlocomoção induzida pela ANF e indica que, apesar de estar sob o efeito da ANF, os animais submetidos ao modelo não apresentaram prejuízo na memória de trabalho em relação ao controle.

Efeitos da administração do ALA, sozinho ou em associação com OLA, sobre as alterações dopaminérgicas em camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por ANF.

Estudos recentes demonstram que a administração de anfetamina causa alterações morfológicas e morte neuronal no hipocampo (ARROYO-GARCÍA *et al.*, 2020) e a ativação persistente desta área cerebral estaria relacionada com a sensibilização comportamental a anfetamina (LODGE; GRACE, 2008). Além disso, um estudo anterior mostrou a influência de ALA nos níveis de dopamina no hipocampo

de ratos (SANTOS *et al.*, 2010). Assim, resolvemos estudar a presença de alterações dopaminérgicas no hipocampo dos animais submetidos ao modelo de mania induzido por ANF e tratados com ALA e OLA.

Papadopoulou-Daifoti e colaboradores (PAPADOPOULOU-DAÏFOTI *et al.*, 1992) sugerem que a razão DOPAC/DA pode ser considerada uma medida do *turnover* de dopamina. A análise neuroquímica revelou um aumento da razão DOPAC/DA no hipocampo dos animais submetidos à administração crônica de anfetamina em comparação ao controle, sugerindo uma maior taxa de renovação deste neurotransmissor. Este achado corrobora com a observação do aumento do estresse oxidativo no hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por anfetamina reportado por MACÊDO *et al.* (2012).

Um estudo recente utilizando o modelo de mania induzido pela injeção intracerebroventricular de ouabaína, um inibidor de Na/K-ATPase, relaciona achados comportamentais de hiperatividade, estereotipicidade e ansiedade diminuída a uma diminuição drástica na recaptação de dopamina e altos níveis de metabólitos de dopamina no estriado (LOPACHEV *et al.*, 2019). Os autores sugerem que estes efeitos teriam sido desencadeados através da ativação de receptores dopaminérgicos, enfatizando a importância da neurotransmissão dopaminérgica estriatal nas alterações comportamentais observadas nos modelos de mania. Por questões metodológicas, não foi possível mensurar os níveis de DA e DOPAC estriatais no presente estudo. Esta análise poderia contribuir com o melhor entendimento das alterações dopaminérgicas induzidas pela ANF e pelas drogas em estudo.

É sabido que os receptores de dopamina D2 são os principais receptores relacionados aos efeitos motores induzidos pela anfetamina (CHAVEZ *et al.*, 2009) e principal alvo farmacológico dos antipsicóticos. A valer, estudos do cérebro de pacientes bipolares demonstram a presença de alterações nos níveis deste receptor (ZOU *et al.*, 2012). Juntamente com eles, os receptores de dopamina D3 também são frequentemente implicados no TAB e como alvo terapêutico de antipsicóticos.

Diferentes achados têm sugerido a ação do ALA sobre estes receptores, o que pode explicar, pelo menos parcialmente, sua reversão dos efeitos comportamentais causados pela anfetamina aqui reportados. Deslauriers e colaboradores (DESLAURIERS *et al.*, 2011) demonstraram que o ALA preveniu o

aumento da expressão de D2 induzida por haloperidol, um antipsicótico de primeira geração, em cultura de células SH-SY5Y.

O principal mecanismo de ação dos antipsicóticos é o antagonismo dos receptores dopaminérgicos. Estes fármacos ocupam o receptor, impedindo que a dopamina se ligue e desempenhe sua função biológica através da sua ativação. Sendo assim, o uso destas drogas pode induzir mecanismos homeostáticos compensatórios na tentativa de restaurar a transmissão dopaminérgica, levando assim a superexpressão dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos.

Na análise de expressão gênica dos receptores, observamos que o tratamento com OLA (ANF+OLA) induziu o aumento da expressão de ambos os receptores D2 e D3 no CE dos animais submetidos à administração crônica de ANF. Interessantemente, o tratamento com ALA (ANF+ALA) também induziu a superexpressão do receptor D3, mas não do D2, o que sugere que ALA age de forma distinta sobre cada um dos receptores.

Em se tratando de drogas psicoestimulantes, como a anfetamina, que aumentam a disponibilidade de dopamina na fenda sináptica, a exposição repetida pode induzir mecanismos compensatórios no sentido contrário dos induzidos pelos antipsicóticos, a fim de inibir a neurotransmissão dopaminérgica. Estes mecanismos podem incluir a redução da síntese de dopamina, superexpressão dos transportadores de dopamina e supraexpressão dos receptores D2 e D3 no estriado.

Tendo em vista as alterações encontradas em relação à expressão gênica dos receptores dopaminérgicos estriatais, este estudo buscou avaliar a interação direta entre as drogas e os receptores D2 e D3 através de metodologias computacionais.

Estudo da interação de DA, ALA e OLA nos receptores de dopamina D2 e D3 através de ensaios computacionais de docking molecular e bioquímica quântica.

Métodos computacionais quânticos combinados com *docking* molecular possibilitam o estudo de interações químicas em biomoléculas complexas, como as proteínas. Esta metodologia tem sido aplicada com sucesso em nosso grupo de pesquisa no estudo da interação de antipsicóticos com receptores dopaminérgicos (ZANATTA *et al.*, 2012, 2014, 2016). Zanatta e colaboradores (ZANATTA *et al.*, 2016) sugeriram, por meio de estudos de *docking* molecular, que o antipsicótico risperidona

poderia assumir duas orientações distintas no sítio de ligação do receptor D3. Neste mesmo estudo, a análise por bioquímica quântica das duas orientações da risperidona no D3 indicou que uma delas geraria uma maior força de ligação com o receptor. Recentemente, a co-cristalização da risperidona no receptor D2 (WANG *et al.*, 2018) revelou que a molécula assumiu uma orientação equivalente àquela de maior energia identificada no estudo citado anteriormente, o que dá suporte à validade do protocolo de *docking* utilizado seguido pela análise por bioquímica quântica no estudo de interações receptor-ligante.

Para uma melhor avaliação da ligação das drogas em estudo, ALA e OLA, nos receptores dopaminérgicos, nós decidimos estudar primeiramente como ocorre a interação do ligante endógeno, a dopamina. Nossos resultados de *docking* molecular demonstraram uma alta conservação do sítio de ligação de DA nos receptores D2 e D3, com 11 resíduos idênticos entre eles. A molécula de dopamina assume posições equivalentes nos dois receptores, com as hidroxilas do catecol (região i) voltadas para a TMH5 e a porção amina (região ii) interagindo com a TMH3. DA mostra proximidade com resíduos de serina na TMH5, com possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. Destaca-se, ainda, a presença de interações com diversos resíduos aromáticos da TMH6 nos dois receptores. De um modo geral, as características mais relevantes dos sítios de ligação de DA, como energia total, energia por estrutura secundária e interações formadas, são muito semelhantes, refletindo a característica de alta conservação destes receptores.

Estudos de mutagênese sugerem que, para a ligação da dopamina, é necessária a formação de uma interação iônica entre a amina protonada da dopamina e a cadeia lateral negativamente carregada de Asp114 no D2 (ou Asp110, no D3) (PLATANIA *et al.*, 2012; SALMAS *et al.*, 2015), resíduo conservado em todos os receptores de aminas biogênicas acoplados à proteína G (HUANG, 2003). De fato, a presença de um grupamento amino protonado é observada nas estruturas de diversas drogas com ação nos receptores D2/D3. Ademais, diversos autores citam a formação desta interação, chamada de ponte salina, como sendo crucial para a ligação a receptores dopaminérgicos. Os resultados de *docking* molecular aqui reportados confirmam a presença desta interação nos complexos formados pela dopamina e pela olanzapina em ambos os receptores estudados. A formação de uma ponte salina com

Asp114(110) também foi observada nas interações de eticloprida e haloperidol no D3 (CHIEN *et al.*, 2010; ZANATTA *et al.*, 2012, 2014) e risperidona no D2 (WANG *et al.*, 2018) e D3 (ZANATTA *et al.*, 2016).

Floresca e Schetz (FLORESCA; SCHETZ, 2004) referem-se à interação com o resíduo aspártico conservado na TMH3 como uma ligação iônica reforçada, pois seria composta não só pela interação iônica eletrostática, mas também por uma ligação de hidrogênio. Curiosamente, dos sistemas em que a ponte salina está presente, apenas em D3-OLA o hidrogênio da amina protonada (na região i de OLA) está voltado para o lado oposto ao resíduo aspártico. Neste caso, a interação estaria reduzida ao componente iônico. De fato, a energia de interação revelada pela análise por bioquímica quântica de OLA com Asp114, no D2, é duas vezes maior do que com seu equivalente no D3, Asp110, enquanto que a energia de interação da dopamina com os dois resíduos é praticamente a mesma. Este resíduo é responsável, em grande parte, pela diferença de afinidade de OLA entre D2 e D3, visto que se desconsiderarmos sua contribuição energética, as energias de interação dos complexos D2-OLA e D3-OLA se tornam muito próximas.

Como pode ser visto nas Figuras 15 e 16, o resultado de *docking* do ALA, que não possui amina protonada em sua estrutura, demonstrou que este ligante não foi capaz de formar uma interação eletrostática com Asp114(110). Tanto na conformação assumida no receptor D2 quanto no D3, a região ii de ALA, porção altamente hidrofóbica do ligante, ficou próxima ao resíduo aspártico carregado, dando origem às energias repulsivas observadas no resultado da análise quântica. Apesar de não apresentar estrutura química favorável para a interação com este resíduo chave, o ALA obteve uma energia total de interação semelhante àquela da dopamina, o que sugere a presença de outros resíduos importantes para a sua ligação aos receptores. Além disso, o estudo das estruturas cristalográficas de D2 e D3 revela a presença de um sítio hidrofóbico estendido localizado acima do sítio ortostérico (CHIEN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2018). Em oposição ao alto grau de conservação do sítio ortostérico, o sítio estendido é formado por resíduos únicos em cada receptor, sendo indicado como alvo crucial para a especificidade de subtipos (CHIEN *et al.*, 2010). Assim, outra possibilidade seria uma modulação no sistema dopaminérgico mediada

pela acomodação de ALA neste sítio estendido, dada a sua característica mais hidrofóbica.

Floresca e Schetz (FLORESCA; SCHETZ, 2004) revisaram a fundo as características do sítio de ligação dos receptores dopaminérgicos. Além da ponte salina com o resíduo aspártico na TMH3, eles citam como características importantes para a ligação aos receptores um microdomínio formado por resíduos de serina na TMH5 e um microdomínio formado por resíduos aromáticos na TMH6. Tanto no D2 quanto no D3, a principal contribuição energética para a interação de ALA vem de resíduos do tipo Serina, porém em posições distintas. No D2, o grupamento carboxílico de ALA, região iii do ligante, forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo Ser193, no microdomínio da TMH5, enquanto que no D3, ALA interage fortemente com Ser182, localizado *na ECL2*. De modo geral, chama atenção a presença de resíduos da ECL2 nos sítios de ligação de DA e ALA no receptor D3, mas não no D2. Além disso, no receptor D3, a ECL2 é a estrutura secundária com maior força de ligação ao ALA. A valer, Chien e colaboradores (CHIEN *et al.*, 2010) reportam a contribuição dos resíduos 182-186 para o sítio de ligação da eticloprida na estrutura cristalográfica do receptor D3.

A interação com o microdomínio aromático na TMH6, formado por Trp386(342), Phe389(345), Phe390(346) e His393(349), é tida como importante para a etapa de ativação dos receptores de dopamina (FLORESCA; SCHETZ, 2004; MOREIRA *et al.*, 2009). Além disso, é reportado na literatura que interações do tipo π -*stacking* com Trp386(342) e His393(349) desempenham um papel na estabilização da posição de ligantes no sítio (FLORESCA; SCHETZ, 2004; HOLST *et al.*, 2009). No presente estudo, todos os ligantes demonstraram importantes interações com resíduos deste microdomínio. A valer, nosso estudo pôde identificar não só interações do tipo π -*stacking*, mas também do tipo π - π T-*shaped*, pi-alquil e pi-sulfur com os resíduos já reportados e com outros resíduos aromáticos tanto na TMH6 quanto na TMH5.

Enquanto que ALA parece se ligar mais fortemente à receptores do tipo D3, os resultados indicam uma preferência de OLA pelo D2. Apesar de haver 8 resíduos a mais na interação D3-OLA em comparação a D2-OLA, nossos resultados apontam para uma maior força de ligação de OLA em receptor D2. OLA apresentou energia

total de interação com os receptores muito maior do que ambos DA e ALA, tendo sido por volta de duas vezes maior para o D2R e 50% maior para o D3R. De fato, esta molécula concorre com a dopamina *in vivo* pela ligação aos receptores dopaminérgicos. Para DA e ALA, é possível observar a presença de resíduos atrativos e repulsivos, enquanto que para OLA foram identificados apenas resíduos atrativos no receptor D2.

Nosso estudo revelou que a interação de ALA é mediada principalmente pela TMH5 e pelos resíduos aromáticos na TMH6, no D2, e pela ECL2 e o microdomínio aromático na TMH6, no D3. Mesmo com importante energia repulsiva ao Asp114(110), ALA teve uma energia total de interação muito próxima à DA no D2 e até mais atrativa do que DA no D3, parecendo ter preferência pelo último. Estes dados corroboram o achado de indução da superexpressão do receptor D3, mas não D2, pelo ALA. A identificação *in silico* de elementos estruturais chave que determinam o perfil farmacológico de ALA fornece uma base importante para o entendimento da ligação de ALA a estes receptores e a sua relação estrutura-atividade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi proposto para investigar a ação do ALA em via dopaminérgica utilizando o modelo de mania induzido por D-anfetamina (ANF), tendo em vista a elucidação de mecanismos moleculares de ação do ALA e a problemática do tratamento farmacológico do TAB. Nossos resultados demonstraram a prevenção do ganho de peso induzido por OLA através da associação com ALA, o que poderia ter importante impacto na clínica no sentido de amenizar os efeitos colaterais dos antipsicóticos e melhorar a adesão dos pacientes ao tratamento. Além disso, este estudo demonstrou a reversão da hiperlocomoção e comportamento exploratório no campo aberto induzidos pela administração crônica de ANF através dos tratamentos com OLA, ALA ou as duas drogas combinadas, e reversão do comportamento de risco induzido por ANF no labirinto em cruz elevado através da administração de ALA sozinho ou combinado com OLA.

Com relação aos efeitos dos tratamentos nos receptores dopaminérgicos estriatais, observamos um aumento da expressão do receptor D2 induzido por OLA, que foi revertido no tratamento com OLA e ALA em associação, e aumento da expressão do receptor D3 induzido por OLA ou ALA, também revertido no tratamento com as duas drogas em associação. O estudo computacional revelou uma possível interação do ALA no sítio ortostérico dos receptores de dopamina D2 e D3, através de um padrão diferente daquele observado para a DA, o ligante endógeno, ou para a OLA, um antipsicótico de segunda geração, além de indicar resíduos chave para estas interações. Juntos, estes resultados demonstram a reversão das alterações comportamentais induzidas por ANF através do uso do ALA, sozinho ou combinado com OLA, e dão suporte às evidências sobre a ação direta de ALA sobre a neurotransmissão dopaminérgica, além de indicar uma ação diferencial desta molécula sobre os receptores D2 e D3. Visto que o ALA já tem eficácia comprovada na clínica na reversão de diversos sintomas neuropsiquiátricos, este estudo buscou aprofundar os conhecimentos sobre os seus diversos sítios e mecanismos de ação, podendo ser útil na ampliação do seu uso clínico.

REFERÊNCIAS

ACKENHEIL, M. Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis. *Journal of affective disorders*, v. 62, n. 1–2, p. 101–111, jan. 2001.

ACKERMANN, T. F. *et al.* Hyperactivity and enhanced curiosity of mice expressing PKB/SGK-resistant glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, v. 25, n. 6, p. 775–786, 2010.

ANDREAZZA, A. C.; DUONG, A.; YOUNG, L. T. Bipolar Disorder as a Mitochondrial Disease. *Biological Psychiatry*, v. 83, n. 9, p. 720–721, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322317320061>>.

ANGST, J.; MARNEROS, A. Bipolarity from ancient to modern times: conception, birth and rebirth. *Journal of affective disorders*, v. 67, n. 1–3, p. 3–19, dez. 2001.

ARENT, C. O. *et al.* Neuroanatomical profile of antimaniac effects of histone deacetylases inhibitors. *Molecular neurobiology*, v. 43, n. 3, p. 207–214, jun. 2011.

ARROLL, M. A.; WILDER, L.; NEIL, J. Nutritional interventions for the adjunctive treatment of schizophrenia: a brief review. *Nutrition journal*, v. 13, p. 91, set. 2014.

ARROYO-GARCÍA, L. E. *et al.* Amphetamine sensitization alters hippocampal neuronal morphology and memory and learning behaviors. *Molecular Psychiatry*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41380-020-0809-2>>.

ASHOK, A. H. *et al.* The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. *Molecular Psychiatry*, v. 22, n. 5, p. 666–679, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/mp.2017.16>>.

BERK, M. *et al.* Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum*, n. 434, p. 41–49, 2007.

BERRIDGE, K. C. *et al.* Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC biology*, v. 3, p. 4, fev. 2005.

BOTTLENDER, R. *et al.* Antidepressant-associated manifold states in acute treatment of patients with bipolar-I depression. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, v. 248, n. 6, p. 296–300, 1998.

BROOKS, J. O.; HOBLYN, J. C.; KETTER, T. A. Metabolic evidence of corticolimbic dysregulation in bipolar mania. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, v. 181, n. 2, p. 136–140, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925492709001966>>.

BROWN, N. C.; ANDREAZZA, A. C.; YOUNG, L. T. An updated meta-analysis of

oxidative stress markers in bipolar disorder. *Psychiatry Research*, v. 218, n. 1, p. 61–68, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165178114002820>>.

BUNNEY, W. E. J. *et al.* Psychobiological and pharmacological studies of manic-depressive illness. *Journal of psychiatric research*, v. 9, n. 3, p. 207–226, set. 1972.

BUTLER, M. *et al.* *No Title*. Rockville (MD): [s.n.], 2018.

CALIPARI, E. S.; FERRIS, M. J. Amphetamine mechanisms and actions at the dopamine terminal revisited. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 33, n. 21, p. 8923–8925, maio 2013.

CAPPELIEZ, P.; MOORE, E. Effects of lithium on an amphetamine animal model of bipolar disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 14, n. 3, p. 347–358, 1990.

CHAVEZ, C. *et al.* Psychotropic drug-induced locomotor hyperactivity and prepulse inhibition regulation in male and female aromatase knockout (ArKO) mice: role of dopamine D1 and D2 receptors and dopamine transporters. *Psychopharmacology*, v. 206, n. 2, p. 267–279, out. 2009.

CHIEN, E. Y. T. *et al.* Structure of the Human Dopamine. *Science*, v. 330, n. 6007, p. 1091–1095, 2010.

CRADDOCK, N.; SKLAR, P. Genetics of bipolar disorder. *Lancet (London, England)*, v. 381, n. 9878, p. 1654–1662, maio 2013.

CROMWELL, H. C.; BERRIDGE, K. C. Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 16, n. 10, p. 3444–3458, maio 1996.

DAO, D. T. *et al.* Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biological psychiatry*, v. 68, n. 9, p. 801–810, nov. 2010.

DAVIES, C. *et al.* Lithium and alpha-methyl-p-tyrosine prevent “manic” activity in rodents. *Psychopharmacologia*, v. 36, n. 3, p. 263–274, abr. 1974.

DAYABANDARA, M. *et al.* Antipsychotic-associated weight gain: management strategies and impact on treatment adherence. *Neuropsychiatric disease and treatment*, v. 13, p. 2231–2241, 2017.

DE ARAÚJO, D. P. *et al.* Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic acid in the model of parkinson’s disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-ohda in rat. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013.

DE SOUZA GOMES, J. A. *et al.* Antimanic-like activity of candesartan in mice: Possible involvement of antioxidant, anti-inflammatory and neurotrophic mechanisms. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 25, n. 11, p. 2086–2097, nov. 2015.

DESLAURIERS, J. *et al.* Antipsychotic-induced DRD2 upregulation and its prevention by α -lipoic acid in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Synapse (New York, N.Y.)*, v. 65, n. 4, p. 321–331, abr. 2011.

DESLAURIERS, J. *et al.* Implication of the ERK/MAPK Pathway in Antipsychotics-induced Dopamine D2 Receptor Upregulation and in the Preventive Effects of (\pm)- α -lipoic acid in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 52, n. 3, p. 378–383, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12031-013-0158-6>>.

FLORESCA, C. Z.; SCHETZ, J. A. Dopamine receptor microdomains involved in molecular recognition and the regulation of drug affinity and function. *Journal of receptor and signal transduction research*, v. 24, n. 3, p. 207–239, ago. 2004.

GERNER, R. H.; POST, R. M.; BUNNEY, W. E. J. A dopaminergic mechanism in mania. *The American journal of psychiatry*, v. 133, n. 10, p. 1177–1180, out. 1976.

GHIBU, S. *et al.* Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 54, n. 5, p. 391–398, nov. 2009.

GITLIN, M. Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies. *International journal of bipolar disorders*, v. 4, n. 1, p. 27, dez. 2016.

GOLDSMITH, D. R.; RAPAPORT, M. H.; MILLER, B. J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular Psychiatry*, v. 21, n. 12, p. 1696–1709, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/mp.2016.3>>.

GONDA, X. *et al.* Suicidal behavior in bipolar disorder: epidemiology, characteristics and major risk factors. *Journal of affective disorders*, v. 143, n. 1–3, p. 16–26, dez. 2012.

GROVER, S.; NEHRA, R.; THAKUR, A. Bipolar affective disorder and its impact on various aspects of marital relationship. *Industrial psychiatry journal*, v. 26, n. 2, p. 114–120, 2017.

HARRISON, P. J.; GEDDES, J. R.; TUNBRIDGE, E. M. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. *Trends in neurosciences*, v. 41, n. 1, p. 18–30, jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29169634>>.

HIBAR, D. P. *et al.* Cortical abnormalities in bipolar disorder: an MRI analysis of 6503 individuals from the ENIGMA Bipolar Disorder Working Group. *Molecular Psychiatry*, v. 23, n. 4, p. 932–942, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/mp.2017.73>>.

HILLER, S. *et al.* Alpha-lipoic acid supplementation protects enzymes from damage by nitrosative and oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1860, n. 1 Pt A, p. 36–45, jan. 2016.

HOLST, B. *et al.* A Conserved Aromatic Lock for the Tryptophan Rotameric Switch in TM-VI of Seven-transmembrane Receptors. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, p. 3973–3985, 1 nov. 2009.

HUANG, E. S. Construction of a sequence motif characteristic of aminergic G protein-coupled receptors. *Protein science : a publication of the Protein Society*, v. 12, n. 7, p. 1360–1367, jul. 2003.

HULVERSHORN, L. A. *et al.* Neural activation during facial emotion processing in unmedicated bipolar depression, euthymia, and mania. *Biological psychiatry*, v. 71, n. 7, p. 603–610, abr. 2012.

JACOBS, D.; SILVERSTONE, T. Dextroamphetamine-induced arousal in human subjects as a model for mania. *Psychological medicine*, v. 16, n. 2, p. 323–329, maio 1986.

JOHNSON, S. L.; CARVER, C. S.; THARP, J. A. Suicidality in Bipolar Disorder: The Role of Emotion-Triggered Impulsivity. *Suicide & life-threatening behavior*, v. 47, n. 2, p. 177–192, abr. 2017.

KALUEFF, A. *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 17, p. 45–59, 17 dez. 2015.

KAPCZINSKI, N. S. *et al.* Cognition and functioning in bipolar depression. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 38, p. 201–206, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462016000300201&nrm=iso>.

KEERS, R. *et al.* Reduced anxiety and depression-like behaviours in the circadian period mutant mouse afterhours. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e38263, 2012.

KLEIN, M. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 16 nov. 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Amphetamine Activation of Hippocampal Drive of Mesolimbic Dopamine Neurons: A Mechanism of Behavioral Sensitization. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 31, p. 7876–7882, 2008. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/28/31/7876>>.

LOGAN, R. W.; MCCLUNG, C. A. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience*, v. 321, p. 163–188, 3 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26314632>>.

LOPACHEV, A. *et al.* Intracerebroventricular injection of ouabain causes mania-like behavior in mice through D2 receptor activation. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 15627, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52058-z>>.

MACÊDO, D. S. *et al.* Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by d-amphetamine. *Bipolar Disorders*, v. 14, n. 7, p. 707–718, 2012.

MALETIC, V.; RAISON, C. Integrated neurobiology of bipolar disorder. *Frontiers in psychiatry*, v. 5, p. 98, 2014.

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*, v. 41, n. 9, p. 2215–2223, ago. 2016.

MARANGONI, C.; FAEDDA, G. L.; BALDESSARINI, R. J. Clinical and Environmental Risk Factors for Bipolar Disorder: Review of Prospective Studies. *Harvard review of psychiatry*, v. 26, n. 1, p. 1–7, 2018.

MELO, M. C. A. *et al.* Chronotype and circadian rhythm in bipolar disorder: A systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, v. 34, p. 46–58, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087079216300594>>.

MINASSIAN, A. *et al.* Repeated assessment of exploration and novelty seeking in the human behavioral pattern monitor in bipolar disorder patients and healthy individuals. *PloS one*, v. 6, n. 8, p. e24185, 2011.

MISSALE, C. *et al.* Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, v. 78, n. 1, p. 189–225, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>>.

MITTAL, M. *et al.* Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, mar. 2014.

MOREIRA, I. *et al.* Structural Basis of Dopamine Receptor Activation. *Dopamine Receptors*. [S.l: s.n.], 2009. p. 47–73.

MÜHLEISEN, T. W. *et al.* Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nature communications*, v. 5, p. 3339, mar. 2014.

MUNEER, A. The Neurobiology of Bipolar Disorder: An Integrated Approach. *Chonnam medical journal*, v. 52, n. 1, p. 18–37, jan. 2016.

NARASIMHAN, M.; BRUCE, T. O.; MASAND, P. Review of olanzapine in the management of bipolar disorders. *Neuropsychiatric disease and treatment*, v. 3, n. 5, p. 579–587, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19300587>>.

NIVOLI, A. M. A. *et al.* Gender differences in a cohort study of 604 bipolar patients: the role of predominant polarity. *Journal of affective disorders*, v. 133, n. 3, p. 443–449, out. 2011.

OURIQUE, G. *et al.* A quantum chemistry investigation of a potential inhibitory drug against the dengue virus. *RSC Advances*, v. 6, 6 jun. 2016.

PACKER, L.; KRAEMER, K.; RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, v. 17, n. 10, p. 888–895, out. 2001.

PAPADOPOULOU-DAÏFOTI, Z. *et al.* [Study of the turnover or the release of brain dopamine in rats after administration of N-linoleyl dopamine]. *Annales pharmaceutiques francaises*, v. 50, n. 4, p. 229–236, 1992.

PARADELLS-NAVARRO, S. *et al.* Neuroprotection of Brain Cells by Lipoic Acid

Treatment after Cellular Stress. *ACS chemical neuroscience*, v. 8, n. 3, p. 569–577, mar. 2017.

PERERA, J. *et al.* Neuroprotective effects of alpha lipoic Acid on haloperidol-induced oxidative stress in the rat brain. *Cell & bioscience*, v. 1, n. 1, p. 12, mar. 2011.

PERRY, W. *et al.* A reverse-translational study of dysfunctional exploration in psychiatric disorders: from mice to men. *Archives of general psychiatry*, v. 66, n. 10, p. 1072–1080, out. 2009.

PERRY, W. *et al.* Quantifying over-activity in bipolar and schizophrenia patients in a human open field paradigm. *Psychiatry research*, v. 178, n. 1, p. 84–91, jun. 2010.

PHILLIPS, M. L.; SWARTZ, H. A. A Critical Appraisal of Neuroimaging Studies of Bipolar Disorder: Toward a New Conceptualization of Underlying Neural Circuitry and a Road Map for Future Research. *American Journal of Psychiatry*, v. 171, n. 8, p. 829–843, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.13081008>>.

PLATANIA, C. B. M. *et al.* Homology Modeling of Dopamine D2 and D3 Receptors: Molecular Dynamics Refinement and Docking Evaluation. *PLOS ONE*, v. 7, n. 9, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044316>>.

RODRIGUES, C. R. F. *et al.* Quantum biochemistry study of the T3-785 tropocollagen triple-helical structure. *Chemical Physics Letters*, v. 559, p. 88–93, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261413000134>>.

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G. F.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, v. 459, n. 7245, p. 356–363, maio 2009.

SAITO, S. *et al.* Cognitive function, treatment response to lithium, and social functioning in Japanese patients with bipolar disorder. *Bipolar disorders*, v. 19, n. 7, p. 552–562, nov. 2017.

SALMAS, R. E. *et al.* Modeling and protein engineering studies of active and inactive states of human dopamine D2 receptor (D2R) and investigation of drug/receptor interactions. *Molecular diversity*, v. 19, n. 2, p. 321–332, maio 2015.

SAMPAIO, L. R. L. *et al.* Electroencephalographic study of chlorpromazine alone or combined with alpha-lipoic acid in a model of schizophrenia induced by ketamine in rats. *Journal of psychiatric research*, v. 86, p. 73–82, mar. 2017.

SANDERS, L. L. O. *et al.* α -Lipoic Acid as Adjunctive Treatment for Schizophrenia: An Open-Label Trial. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 37, n. 6, 2017. Disponível em: <https://journals.lww.com/psychopharmacology/Fulltext/2017/12000/___Lipoic_Acid_a_s_Adjunctive_Treatment_for.11.aspx>.

SANTOS, Ã. M. DE S. *et al.* Alterations on monoamines concentration in rat hippocampus produced by lipoic acid. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 68, p. 362–366, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2010000300006&nrm=iso>.

SCAINI, G. *et al.* Neurobiology of bipolar disorders: a review of genetic components, signaling pathways, biochemical changes, and neuroimaging findings. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 42, p. 536–551, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462020000500536&nrm=iso>.

SCHAFFER, A. *et al.* International Society for Bipolar Disorders Task Force on Suicide: meta-analyses and meta-regression of correlates of suicide attempts and suicide deaths in bipolar disorder. *Bipolar disorders*, v. 17, n. 1, p. 1–16, fev. 2015.

SESTAKOVA, N. *et al.* Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary toxicology*, v. 6, n. 3, p. 126–135, set. 2013.

SHAY, K. P. *et al.* Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1790, n. 10, p. 1149–1160, out. 2009.

SILVA, M. C. C. *et al.* Augmentation therapy with alpha-lipoic acid and desvenlafaxine: a future target for treatment of depression? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 386, n. 8, p. 685–695, ago. 2013.

SILVA, M. C. C. *et al.* Evidence for protective effect of lipoic acid and desvenlafaxine on oxidative stress in a model depression in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 64, p. 142–148, jan. 2016.

SOUSA, B. L. *et al.* Explaining RANKL inhibition by OPG through quantum biochemistry computations and insights into peptide-design for the treatment of osteoporosis. *RSC Adv.*, v. 6, n. 88, p. 84926–84942, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA16712H>>.

SOUSA, C. *et al.* Alpha-lipoic acid in the treatment of psychiatric and neurological disorders: a systematic review. *Metabolic Brain Disease*, v. 34, 22 nov. 2018.

SOUSA, C. *et al.* Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. *Psychiatry research*, v. 230, 2015.

TIBULLO, D. *et al.* Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, v. 66, n. 11, p. 947–959, nov. 2017.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, v. 111, n. 3, p. 323–331, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02244948>>.

UÇOK, A.; GAEBEL, W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, v. 7, n. 1, p. 58–62, fev. 2008.

VALVASSORI, S. S. *et al.* The role of neurotrophic factors in manic-, anxious- and depressive-like behaviors induced by amphetamine sensitization: Implications to the

animal model of bipolar disorder. *Journal of affective disorders*, v. 245, p. 1106–1113, fev. 2019.

VAN DEN BUUSE, M. Modeling the Positive Symptoms of Schizophrenia in Genetically Modified Mice: Pharmacology and Methodology Aspects. *Schizophrenia Bulletin*, v. 36, n. 2, p. 246–270, 9 nov. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/schbul/sbp132>>.

VASCONCELOS, G. S. *et al.* Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. *Schizophrenia research*, v. 165, n. 2–3, p. 163–170, jul. 2015.

VERMA, J. K.; MOHAPATRA, S. *Mirtazapine withdrawal-induced mania*. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. [S.l.: s.n.], 2015

VIETA, E. *et al.* Bipolar disorders. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, p. 18008, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.8>>.

WALTERS, A. S. *et al.* Review of the possible relationship and hypothetical links between attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and the simple sleep related movement disorders, parasomnias, hypersomnias, and circadian rhythm disorders. *Journal of clinical sleep medicine: JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine*, v. 4, n. 6, p. 591–600, dez. 2008.

WANG, S. *et al.* D4 dopamine receptor high-resolution structures enable the discovery of selective agonists. *Science*, v. 358, n. 6361, p. 381–386, 2017. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/358/6361/381>>.

WANG, S. *et al.* Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature*, v. 555, n. 7695, p. 269–273, mar. 2018.

WISE, T. *et al.* Voxel-Based Meta-Analytical Evidence of Structural Disconnectivity in Major Depression and Bipolar Disorder. *Biological Psychiatry*, v. 79, n. 4, p. 293–302, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000632231500195X>>.

YATES, J. W. *et al.* Bimodal effect of amphetamine on motor behaviors in C57BL/6 mice. *Neuroscience letters*, v. 427, n. 1, p. 66–70, out. 2007.

YOUNG, J. W.; DULCIS, D. Investigating the mechanism(s) underlying switching between states in bipolar disorder. *European journal of pharmacology*, v. 759, p. 151–162, jul. 2015.

YOUNG, J. W.; HENRY, B. L.; GEYER, M. A. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. *British Journal of Pharmacology*, v. 164, n. 4, p. 1263–1284, out. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01318.x>>.

ZANATTA, G. *et al.* Antipsychotic haloperidol binding to the human dopamine D3 receptor: beyond docking through QM/MM refinement toward the design of improved schizophrenia medicines. *ACS chemical neuroscience*, v. 5, n. 10, p. 1041–1054, out. 2014.

ZANATTA, G. *et al.* Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, v. 5, p. 155–162, 2012.

ZANATTA, G. *et al.* Two Binding Geometries for Risperidone in Dopamine D3 Receptors: Insights on the Fast-Off Mechanism through Docking, Quantum Biochemistry, and Molecular Dynamics Simulations. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 7, n. 10, p. 1331–1347, 19 out. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00074>>.

ZHAO, H. *et al.* Neurochemical effects of the R form of α -lipoic acid and its neuroprotective mechanism in cellular models of Parkinson's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 87, p. 86–94, jun. 2017.

ZHOU, Z. *et al.* Chronic treatment with mood stabilizer lithium inhibits amphetamine-induced risk-taking manic-like behaviors. *Neuroscience Letters*, v. 603, p. 84–88, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394015300471>>.

ZHUANG, X. *et al.* Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 4, p. 1982 LP – 1987, 13 fev. 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/98/4/1982.abstract>>.

ZOU, Y.-F. *et al.* Association of DRD2 gene polymorphisms with mood disorders: a meta-analysis. *Journal of affective disorders*, v. 136, n. 3, p. 229–237, fev. 2012.

APÊNDICE A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO α -LIPÓICO (ALA) NO MODELO DE MANIA INDUZIDA POR D-ANFETAMINA", protocolada sob o CEUA nº 4796010219 (ID 000852), sob a responsabilidade de **Silvânia Maria Mendes Vasconcelos e equipe; Letícia Régia Lima Cavalcante** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 12/03/2019.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF THE BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL EFFECTS OF THE ADMINISTRATION OF ALPHA-LOPOIC ACID ON THE ANIMAL MODEL OF MANIA INDUCED BY D-AMPHETAMINE", utilizing 180 Heterogenics mice (180 females), protocol number CEUA 4796010219 (ID 000852), under the responsibility of **Silvânia Maria Mendes Vasconcelos and team; Letícia Régia Lima Cavalcante** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/12/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2019** a **06/2020**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **32 a 42 dias**

N: **180**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: As atividades propostas serão realizadas no biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, 23 de novembro de 2020

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará