



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

**POLIANA NORONHA BARROSO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE**  
**TRANSTORNO BIPOLAR BIFÁSICO EM RATOS**

**FORTALEZA**

**2019**

**POLIANA NORONHA BARROSO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSTORNO  
BIPOLAR BIFÁSICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia Clínica. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.

Co-orientadora: PhD Maria Elisabete Amaral de Moraes.

**FORTALEZA**

**2019**

**POLIANA NORONHA BARROSO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSTORNO  
BIPOLAR BIFÁSICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia Clínica. Área de concentração: Neurofarmacologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Tatiana de Queiroz Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Cynthia de Freitas Montenegro  
Centro Universitário Maurício de Nassau (Uninassau)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

B285d Barroso, Poliana Noronha.  
Desenvolvimento de um modelo experimental de Transtorno Bipolar bifásico em ratos /  
Poliana Noronha Barroso. – 2019.  
45 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.

Coorientação: Prof. Dr. Maria Elisabete Amaral de Moraes.

1. Transtorno Bipolar. 2. Mania. 3. Depressão. 4. Anfetamina. 5. Modelo experimental. I.  
Título.

CDD 615.1

---

Não é “simplesmente” uma Dissertação,  
um Mestrado, um Diploma. Trata-se de parte  
importante de um projeto de vida, de exercício  
de alma, de uma etapa vencida.

Dedico este trabalho, carinhosamente, aos  
meus pais José Nacelo Marques Barroso e  
Maria Leni Noronha Barroso, razões, raízes e  
orgulho da minha vida; e aos meus irmãos  
Germano e Juliana, e seus respectivos  
“queridos galhos”, por vibrarem sempre pela  
nossa vitória.

A Deus, por ter-me concedido a  
oportunidade da Vida, pelo Seu amparo  
incessante e pelas graças atingidas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Gislei Frota Aragão, por ter me acolhido no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e acreditado no meu potencial; pela sua orientação e seu apoio, sempre generoso, e pelas inúmeras oportunidades de aprendizagem.

Aos amigos Adriano Chaves e Tatiana de Queiroz, por terem compartilhado comigo muito além dos seus valiosos conhecimentos; muniram-me de ferramentas, nutriram-me de coragem e vivenciaram comigo o conceito de cooperação e companheirismo no seu mais amplo sentido.

À Profa. Dra. Danielle Macêdo, pelo acolhimento no Laboratório de NeuroFarmacologia (LNF), por todo apoio e reconhecimento do meu esforço na tentativa de desenvolver um bom trabalho.

A todos do LNF, em especial às amigas Paloma Jucá e Michelle Verde, por toda ajuda imensurável desde os testes e experimentos à organização dos dados, e pelo privilégio de aprender com vocês.

Ao Prof. Francisco Vagnaldo Fachine, pelos inúmeros ensinamentos e sua dedicação no decorrer de todo o mestrado. Obrigada por sempre acreditar em mim.

À Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, pela oportunidade e pela colaboração.

Ao amigo Evanir, pela ajuda valiosa durante os testes e por partilhar generosamente seu gabinete, seu café e suas experiências.

A todos os meus amigos e companheiros de trabalho no Instituto Dr José Frota (IJF), no Instituto de Saúde e Gestão Hospitalar (ISGH) e no Centro Universitário Estácio do Ceará, por todo apoio e incentivo para a realização desse trabalho.

Às amigas Elidiane Martins e Emanuella Carneiro, e ao amigo Arteiro Menezes, por todas as vibrações de sucesso, neste e em vários outros desafios profissionais e pessoais.

Aos meus companheiros de Turma no Mestrado, em especial ao Marco Antônio e a Wandressa Francelino, pela amizade, colaboração e exemplo de dedicação.

Às secretárias Fábiana Lima, Ludilene Ponte e Tereza, pela imensa atenção, paciência e ajuda no decorrer dessa empreitada.

Aos professores da banca de qualificação e defesa pelas importantes contribuições.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia Clínica, por terem colaborado nessa jornada pela busca de conhecimento.

A todos os Seguranças do NPDM, pelo acolhimento e proteção, especialmente em dias de trabalho intenso e noites adentro.

A todos os colaboradores do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF), em especial à Coordenadora e Veterinária Gabriela Mariângela pela sua preciosa ajuda, encorajamento e ensinamentos; Ao Sr Moreira e Sr Adauto pelo cuidado com os animais; à Nayara, Aline e Sr Aroldo, pela constante disponibilidade em ajudar.

A todos os colaboradores do Biotério do NPDM, em especial ao Coordenador e Veterinário Wesley Ribeiro, pelo seu apoio e suporte.

Aos animais, por viabilizarem não apenas o meu estudo, mas o aprimoramento do conhecimento científico e da qualidade de vida. E, de maneira particular, por me suscitarem a compreensão da seriedade das pesquisas realizadas com animais, me fortalecendo o empenho e propósito de fazer valer os seus sacrifícios.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

O transtorno bipolar (TB) é uma condição psiquiátrica séria e incapacitante, que atinge 2% da população mundial. Clinicamente, caracteriza-se por uma variação cíclica de fases do humor, entre a mania (ou euforia) e a depressão. Em decorrência de sua complexidade clínica, o desenvolvimento de um modelo animal que reproduza eficazmente o TB permanece um desafio para os pesquisadores da área. Na literatura científica, o uso de modelos animais para mimetizar o TB têm focado nas fases separadas do transtorno, e poucos estudos têm validado estratégias que incluam as fases de euforia e depressão em uma só trajetória experimental. O desenvolvimento de um modelo animal envolve a validação de três critérios: a) a validade aparente (de face), que se refere a quão adequadamente o modelo induz os sinais e sintomas da doença modelada; b) a validade de constructo (etiológica), que analisa a capacidade de um modelo reproduzir o processo etiopatológico e os mecanismos fisiopatológicos da doença e suas alterações biológicas; e c) a validade preditiva (farmacológica), na qual se avalia a resposta do modelo a abordagens terapêuticas para a doença em questão, se esta pode ser revertida ou atenuada por um tratamento, e se é possível prever os efeitos da intervenção em seres humanos. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um modelo de TB induzido pela administração repetida de anfetamina em ratos. Para tanto, ratos Wistar machos receberam anfetamina em dois protocolos distintos, para induzir sintomas tipo-maníaco e tipo-depressivo. No fenótipo maníaco, os animais receberam 7 dias de tratamento com anfetamina (2,0 mg/kg). No sétimo dia, os ratos foram submetidos a testes comportamentais. Para o fenótipo depressivo, os animais receberam anfetamina (2,0 mg/kg) por 7 dias, a qual foi suspensa do 8º ao 21º dia. Findo este período, os ratos foram igualmente submetidos aos testes de comportamento. Adicionalmente, um grupo de animais tratados com lítio foi incluído em cada protocolo, a fim de avaliar o potencial de reversão das alterações induzidas pelo modelo. Os resultados mostraram que o protocolo da Fase Mania promoveu comportamento tipo-maníaco nos animais. No protocolo Fase Depressão, o teste da Preferência por Sacarose evidenciou comportamento tipo-depressivo, o qual tem alta relevância na avaliação da

depressão. O desenvolvimento de pesquisas adicionais será necessário para consolidar este modelo de duas fases no estudo de Transtorno Bipolar.

Palavras-chave: Transtorno bipolar, Mania, Depressão, Anfetamina.

## ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a serious and disabling psychiatric condition that affects 2% of the world's population. Clinically, it is characterized by a cyclic variation of mood phases, between mania (or euphoria) and depression. Due to its clinical complexity, the development of an animal model that effectively reproduces BD remains a challenge for researchers in this field. In scientific literature, the use of animal models to mimic BD has focused on separate phases of the disorder, and few studies have validated strategies that include both manic and depressive phases in one experimental trajectory. The development of an animal model involves the validation of three criteria: a) face validity, which refers to how adequately the model induces the signs and symptoms of the modeled disease; b) the construct validity, which analyzes the ability of a model to reproduce the etiopathological process and the pathophysiological mechanisms of the disease and its biological alterations; and c) the predictive (pharmacological) validity, in which we assess the model's response to therapeutic approaches to the disease, if it can be reversed or attenuated with treatment, and if we can predict the effects of the intervention in human subjects. In this study, we developed a model of BD induced by repeated administration of amphetamine in rats. For this, male Wistar rats were treated with amphetamine in two different protocols, to induce manic and depressive symptoms. In the manic phenotype, the animals received 7 days of amphetamine treatment (2.0 mg/kg). On the seventh day, the rats underwent behavioral testing and were sacrificed for removal of brain areas. For the depressive phenotype, the animals received 7 days of amphetamine treatment (2.0 mg/kg), which was suspended from the 8th to the 21st day. After this period, the rats were equally evaluated and sacrificed. Additionally, a group of lithium-treated animals was included in each protocol, to assess the reversal potential of model-induced changes. The results showed that the Phase Mania protocol promoted manic-type behavior in animals. In the Phase Depression protocol, the Sucrose Preference test promoted depressive-type behavior, which is highly relevant in the assessment of depression. Further research will be needed to consolidate this two-phase model in the study of Bipolar Disorder.

Keywords: Bipolar disorder, Mania, Depression, Amphetamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<a href="#">Figura 1 - Episódios de humor no Transtorno Bipolar</a> .....	8
<a href="#">Figura 2 - Esquema do protocolo Mania</a> .....	19
<a href="#">Figura 3 - Esquema do Protocolo Mania, tratamento com lítio</a> .....	19
<a href="#">Figura 4 - Esquema do Protocolo Fase Depressão</a> .....	20
<a href="#">Figura 5 - Esquema do Protocolo Fase Depressão, com tratamento com Lítio</a> .....	20
20	
<a href="#">Figura 6 - Teste Campo Aberto</a> .....	21
<a href="#">Figura 7 - Teste do Splash</a> .....	22
<a href="#">Figura 8 - Teste de preferência por sacarose</a> .....	23
<a href="#">Figura 9 - Ilustração do Teste de nado forçado</a> .....	24
<a href="#">Figura 10 - Teste do odor do gato (t = tecido impregnado com odor do gato; a=abrigo lado oposto)</a> .....	25
<a href="#">Figura 11 - N° de cruzamentos, no Teste do Campo Aberto</a> .....	27
<a href="#">Figura 12 - N° de entradas no centro, no Teste do Campo Aberto</a> .....	27
<a href="#">Figura 13 - Tempo no centro, no Teste do Campo Aberto</a> .....	28
<a href="#">Figura 14 - Tempo de latência para início do comportamento de grooming, no Teste do Splash</a> .....	28
<a href="#">Figura 15 - N° de groomings, no Teste do Splash</a> .....	29
<a href="#">Figura 16 - Tempo de grooming, no Teste do Splash</a> .....	29
<a href="#">Figura 17 - Resultado do Teste de Preferência por Sacarose</a> .....	30
<a href="#">Figura 18 - Tempo de Imobilidade, no Teste de Nado Forçado</a> .....	31
<a href="#">Figura 19 - Tempo de contato com o tecido neutro e com o tecido com odor de gato, no Teste do Odor do Gato</a> .....	32
<a href="#">Figura 20 - N° de contato com o tecido neutro e com o tecido com odor de gato, no Teste do Odor do Gato</a> .....	32
<a href="#">Figura 21 - Tempo do abrigo, no Teste do Odor do Gato</a> .....	33
<a href="#">Figura 22 - N° de vezes no abrigo, no Teste do Odor do Gato</a> .....	33

# SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u> .....	8
<u>1.1 TRANSTORNO BIPOLAR</u> .....	8
<u>1.2 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DO TB</u> .....	10
<u>1.2.1 Alterações nos sistemas de monoaminas</u> .....	10
<u>1.2.2 Estresse Oxidativo no TB</u> .....	12
<u>1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO NO TRANSTORNO BIPOLAR</u> .....	13
<u>1.4 MODELO ANIMAL DE MANIA</u> .....	14
<u>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</u> .....	15
<u>3 OBJETIVOS</u> .....	16
<u>3.1 OBJETIVO GERAL</u> .....	16
<u>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u> .....	16
<u>4 MATERIAL E MÉTODOS</u> .....	17
<u>4.1 ASPECTOS ÉTICOS</u> .....	17
<u>4.2 ANIMAIS</u> .....	17
<u>4.3 DROGAS E SOLUÇÕES</u> .....	17
<u>4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO</u> .....	18
<u>4.4.1 Fase Mania</u> .....	19
<u>4.4.2 Fase Depressão</u> .....	20
<u>4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS</u> .....	21
<u>4.5.1 Teste do Campo Aberto</u> .....	21
<u>4.5.2 Teste do Splash</u> .....	22
<u>4.5.3 Teste da Preferência por Sacarose</u> .....	22
<u>4.5.4 Teste de Nado Forçado</u> .....	23
<u>4.5.5 Teste de odor de gato</u> .....	24
<u>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</u> .....	26
<u>6 RESULTADOS</u> .....	26
<u>7 DISCUSSÃO</u> .....	34
<u>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</u> .....	38

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Transtorno Bipolar

O Transtorno Bipolar (TB), ou Transtorno Afetivo Bipolar, é um transtorno psiquiátrico complexo caracterizado por alterações graves de humor, que envolvem períodos de humor elevado e de depressão (polos opostos da experiência afetiva) intercalados por períodos de remissão, e estão associados a sintomas cognitivos, físicos e comportamentais específicos (BOSAIPO; BORGES; JURUENA, 2017).

A quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM 5) classifica assim o Transtorno Bipolar (TB): Tipo I, caracterizado pela elevação grave e persistente do humor (mania); Tipo II, que se caracteriza por elevação do humor de forma mais branda (hipomania); e o quadro de Transtorno Ciclotímico, caracterizado pela alternância entre períodos hipomaniacos e depressivos ao longo de pelo menos dois anos em adultos (ou um ano em crianças) sem, entretanto, atender os critérios para um episódio de mania, hipomania ou depressão maior (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2016). A especificação “com características mistas” é aplicada aos estados em que há alternância dos dois sintomas maníacos e depressivos, apesar de serem vistos como polos opostos do humor (Figura 1) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Figura 1 - Episódios de humor no Transtorno Bipolar.

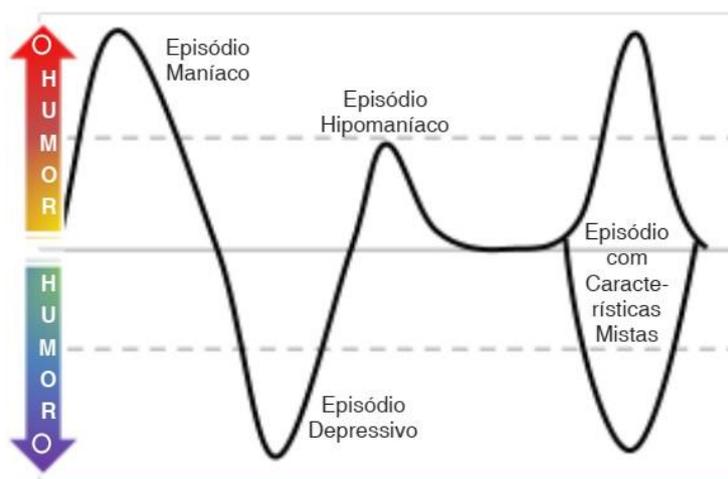


Figura 1. O curso da doença de um paciente pode ser registrado em gráfico de humor. Desse modo, um exemplo de como o humor pode variar é da hipomania para mania no topo da figura, para a eutímia (ou humor normal) no meio, e para a depressão na extremidade inferior da figura. (Adaptado de BOSAIPO; BORGES; JURUENA, 2017).

O TB afeta aproximadamente 2% da população mundial e apresenta prevalência igual em ambos os sexos, raça ou condição geográfica (MUNEER, 2017). Estudos recentes mostram que o TB afeta a funcionalidade, pois prejudica o indivíduo na sua capacidade de interagir com a sociedade, levando ao desemprego, isolamento e disfunção em geral. O manejo do TB é um desafio para a psiquiatria devido à dificuldade de diagnóstico, tratamento e prevenção de incapacidade (KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, 2016).

A alternância recorrente de humor, típica do TB, acaba por afetar relacionamentos e atividades diárias simples, piorando a qualidade de vida tanto deste quanto de seus familiares. A prevalência deste transtorno durante a vida é de aproximadamente 1% (KESSLER et al. 1994), no entanto, Kessler e colaboradores (2005), apresentaram um amplo estudo de base populacional recente onde essa prevalência pode chegar a 4% quando se considera formas mais brandas do TB. Para os que apresentam a psicopatologia, o risco de suicídio é de 20 % (GOLBERT; HARROW, 2004), o que torna este transtorno um grave problema de saúde pública.

Ainda quanto à classificação, e levando em conta a duração dos episódios, a mania pode ser severa com alto grau de irritabilidade, que pode estar associada ou não a sintomas psicóticos, promovendo alterações no comportamento e funcionalidade do indivíduo. O estado de mania deve ser de uma semana, no mínimo, associado a irritabilidade ou humor alterado. Na hipomania as elevações de humor e os distúrbios comportamentais/funcionais são menos graves e com duração mais breve que o estado de mania (quatro dias consecutivos), o que geralmente não coloca a pessoa perante atenção médica. No entanto, a hipomania pode progredir para a mania (ANDERSON; HADDAD; SCOTT, 2012)

Já nos quadros de depressão do TB, as características são marcadas pelo humor deprimido ou perda de interesse/prazer por quase todas as atividades durante pelo menos duas semanas. Ademais, o indivíduo pode apresentar alterações no peso, apetite, sono, atividade psicomotora, diminuição da energia; sentimento de culpa e/ou desvalia; dificuldade para pensar ou concentrar-se ou tomar decisões; pensamentos recorrentes sobre a morte, ideação, planos ou mesmo tentativas suicidas. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

É provável que a estimativa de casos de TB em alguns serviços de saúde mental seja mascarada por diagnósticos errôneos da doença. Diversos pacientes que procuram atenção médica com queixas depressivas recebem inicialmente o diagnóstico de transtorno depressivo maior antes que seja investigada a ocorrência prévia de episódios de mania ou hipomania. Sendo o tratamento da depressão unipolar e do TB diferentes, é fundamental que seja feito um diagnóstico correto para que se possa ter sucesso no tratamento (BOSAIPO; BORGES; JURUENA, 2017) .

## **1.2 Mecanismos Fisiopatológicos do TB**

Ainda que TB seja um alvo cada vez mais crescente de estudos científicos, suas causas neurofisiológicas permanecem incertas. No entanto, diversas pesquisas já evidenciaram a existência de alterações anatômicas e fisiológicas, como alterações de citocinas inflamatórias e danos oxidativos em pacientes portadores de TB.

### **1.2.1 Alterações nos sistemas de monoaminas**

Sabe-se que pacientes depressivos apresentam baixos níveis de aminas biogênicas: noradrenalina, serotonina e dopamina. Esses neurotransmissores atuam, dentre outros, no sistema límbico, modulando

funções endócrinas, o ciclo sono-vigília, o apetite e, finalmente, os estados comportamentais. Os antidepressivos, portanto, atuam regulando a excitabilidade neuronal e a disponibilidade dessas aminas. Alterações na regulação dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico foram sugeridas estarem envolvidas no TB uma vez que pesquisadores observaram que alguns pacientes bipolares depressivos quando tratados com antidepressivos, especialmente tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase (MAO), alternavam seu quadro depressivo para o maníaco (BOTTLENDER et al., 1998).

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

Portanto, devido a suas respectivas funções, vários sintomas de humor, cognição e comportamento (ex.: aumento da atividade psicomotora) estariam relacionados com a hiperatividade deste sistema. Uma relação entre o sistema dopaminérgico e o TB foi definitivamente estabelecida uma vez que substâncias psicoestimulantes (anfetamina e a cocaína) e a L-dopa (precursor da dopamina utilizado no tratamento da doença de Parkinson), que atuam de forma a aumentar a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, podem induzir o estado maníaco em pacientes bipolares ou pessoas que tenham predisposição para tal (ACKENHEIL, 2001).

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

bipolar (KUNUGI et al., 1997). Do mesmo modo, pesquisadores encontraram evidências de que pacientes em quadro de mania apresentam níveis aumentados de 3-metoxi-4-hidroxifenilmetil-glicol (MHPG), metabólito da noradrenalina (SWANN et al., 1983). Quando os pacientes são tratados com lítio, apresentam uma baixa significativa nesses indicadores (SWANN et al., 1987). Em contrapartida, no estado depressivo, observou-se que o funcionamento do sistema noradrenérgico encontra-se diminuído uma vez que baixas concentrações desse metabólito foram evidenciadas (EDWARDS et al., 1980).

### **1.2.2 Estresse Oxidativo no TB**

A fosforilação oxidativa, encarregada de gerar energia celular, é responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), compostos que possuem elétrons desemparelhados, reativos e capazes de promover danos à célula. A célula tem mecanismos de proteção, os antioxidantes, que podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos, dependendo da sua estrutura e forma de ação. Entre as enzimas antioxidantes, temos como exemplo a superóxido dismutase (SOD) que atua transformando ânions radicais superóxidos em 23 peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) que agem sobre o peróxido de hidrogênio convertendo-o em água e oxigênio. Entre os antioxidantes não enzimáticos, podemos citar a glutathione (GSH) que atua em conjunto com a enzima GPx, a vitamina C que possui ação de “*scavenger*” (transforma radicais livres em formas menos reativas) e de restaurar a vitamina E, e a própria vitamina E que atua nas membranas plasmáticas devido ao seu caráter lipofílico. O estresse oxidativo ocorre quando se estabelece um desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade da célula de eliminá-las através de seus mecanismos antioxidantes. Esse desequilíbrio surge quando a produção de EROs é aumentada bruscamente ou quando os mecanismos antioxidantes celulares não funcionam corretamente ou o suficiente. Isso causa uma destruição de moléculas, como o DNA, lipídeos e proteínas, que pode levar a morte celular (BIEWENGA et al., 1997).

### 1.3 Tratamento Farmacológico no Transtorno Bipolar

O tratamento farmacológico do TB está orientado sobretudo para a fase aguda do transtorno, no qual o objetivo é tratar o paciente com mania ou depressão, para a recuperação sintomática, levando-o ao estado de eutímia. Ademais, o tratamento de manutenção ou profilaxia é necessário no TB para a prevenção de episódios de mania e/ou depressão, e potencializar a recuperação funcional do paciente. Contudo, o tratamento de ambas as fases do TP pode ser complexo, pois os antidepressivos podem provocar mania ou hipomania no paciente bipolar e os tratamentos que agem sobre os episódios maníacos, podem levar a depressão (GEDDES, MIKLOWITZ, 2013). O lítio (Li), que é um estabilizador de humor, é único fármaco aprovado especificamente para o tratamento do TB. No entanto, outros fármacos também podem ser utilizados para o tratamento deste transtorno. Os fármacos mais prescritos e estudados no TB são o Li e o VPA e, apesar de grande parte dos mecanismos de ação permanecer desconhecidos, alguns alvos bioquímicos desses medicamentos foram relatados (ZARATE et al., 2006; BACHMANNET al., 2009). Os fármacos citados anteriormente são utilizados principalmente no tratamento da fase maníaca, mas há de se ressaltar os fármacos utilizados durante a fase da depressão bipolar. O tratamento na fase da depressão bipolar é um desafio na prática clínica, pois, o uso de antidepressivos pode desencadear episódio de mania. Inibidores da recaptção de serotonina e a bupropiona, um inibidor da recaptção de dopamina, são os antidepressivos mais usados para tratar a depressão em pacientes bipolares (SACHS et al., 2000). Apesar de estes fármacos tenham mostrado sua eficácia no tratamento da depressão unipolar, não existem estudos que mostrem seus efeitos no tratamento do TB (GHAEMI, et al., 2001; SACHS et al., 2007). Considerando que pacientes bipolares possuem danos graves que são agravados a cada episódio do humor, a escolha do fármaco para o tratamento da depressão bipolar não depende somente do conhecimento sobre a eficácia do medicamento, como também dos riscos associados (GHAEMI, et al., 2001). Embora tenha sido um grande avanço o tratamento do TB com Li, anticonvulsivantes, antipsicóticos atípicos e antidepressivos, muitos pacientes não respondem satisfatoriamente a esses

fármacos (KECK, 2003). Outrossim, desde a identificação dos efeitos antimaníacos de Li, não foram desenvolvidos outros fármacos específicos para o tratamento do TB que tenha uma ação precisa em ambos os polos do humor, exigindo novas abordagens terapêuticas. A falta de conhecimento sobre a fisiopatologia deste transtorno é uma dificuldade para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do TB. Os modelos animais são importantes para o estudo da neurobiologia do TB e para o teste de novos fármacos. Entretanto, o desenvolvimento de um modelo animal adequado para o TB tem sido um importante desafio para os pesquisadores da área (MANJI e CHEN, 2002; EINAT et al., 2003).

#### **1.4 Modelo Animal de Mania**

Os modelos animais existentes de TB se concentram em comportamentos do tipo mania ou depressão. Esses modelos são importantes e muitos têm validade preditiva para identificar medicações com potencial terapêutico para o tratamento da mania ou da depressão.

Estudos anteriores, Ellenbroek e Cools (1990) descrevem que, para ser válido, um modelo animal em transtornos psiquiátricos deve demonstrar três características principais: mimetizar os sintomas da doença determinada (validade de face), simular condições fisiopatológicas da patologia (validade de construto) e, por fim, reverter os sintomas induzidos no modelo pelo uso de agentes terapêuticos usados no tratamento do determinado transtorno (validade preditiva).

Os modelos animais de transtornos psiquiátricos mimetizam a etiologia e/ou a fisiopatologia dessas doenças e são classificados de acordo com sua forma de indução. Os modelos ambientais, por sua vez, induzem comportamentos típicos através de intervenções e alterações do meio em que o animal vive, comumente tentando reproduzir situações-gatilho em pacientes. Enquanto os modelos farmacológicos promovem modificações fisiopatológicas e comportamentais por meio de alterações bioquímicas induzidas por

substâncias. Os modelos cirúrgicos fundamentam-se na alteração morfológica ou retirada de uma determinada estrutura cerebral. Por fim, os modelos genéticos são desenvolvidos através da alteração da expressão de genes relacionados ao transtorno (VALVASSORI et al., 2019).

## **2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

Com base no exposto, fica evidente que o TB é uma condição psiquiátrica séria e incapacitante, com repercussões significativas na qualidade de vida de pacientes com TB e seus familiares. Em decorrência de sua complexidade clínica, o desenvolvimento de um modelo animal que reproduza eficazmente o TB permanece um desafio para os pesquisadores da área. Na literatura científica, o uso de modelos animais para mimetizar o TB têm focado nas fases separadas do transtorno, e poucos estudos têm validado estratégias que incluam as fases de euforia e depressão em uma só trajetória experimental. Portanto, desenvolver um modelo animal que simule a fase de mania e a de depressão bipolar é de extrema relevância, no intuito de contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia da variação cíclica do humor típica deste transtorno, e para subsidiar pesquisas de alternativas terapêuticas para o tratamento de ambas as fases da doença.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Desenvolver um modelo experimental de Transtorno Bipolar de duas fases em ratos, induzido pela administração de d-Anfetamina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as alterações comportamentais tipo-mania e tipo-depressão causadas aos animais pela administração de d-anfetamina, por meio dos seguintes testes:
  - Campo Aberto;
  - Splash;
  - Teste de Preferência por Sacarose;
  - Nado forçado;
  - Odor do gato.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) através do protocolo 78/2016 e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação (Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América).

### **4.2 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 250 e 300g provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC. Foram utilizados 8 animais por grupo de tratamento, acondicionados em grupos de 4 animais por caixa, à temperatura média de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

### **4.3 Drogas e soluções**

Foram utilizados a D-anfetamina (D-ANF) e o carbonato de lítio (Li), obtidos na Sigma (St. Louis, MO, USA). A dose utilizada de D-ANF foi de 2mg/kg (QUEVEDO, JOÃO; RESENDE, WILSON RODRIGUES; VARELA, 2014) e a de Lítio foi de 47,5mg/kg (QUEIROZ, 2017). As drogas eram preparadas diariamente e dissolvidas em solução salina a 0,9% (SAL), sendo administradas por via intraperitoneal (ip), 1 vez ao dia.

#### 4.4 Protocolo experimental e tratamento

Para contemplar as duas fases do humor do TB, foram desenvolvidos dois protocolos distintos que, hipoteticamente, induzem a sintomas tipo-maníaco e tipo-depressivo, e que foram nomeados de protocolo de FASE MANIA (ver Quadro 1) e FASE DEPRESSÃO (Quadro 2), respectivamente. Cada protocolo contou com três grupos de tratamento: a) grupo D-anfetamina, para induzir os fenótipos mania e/ou depressão; b) grupo controle negativo, tratado apenas com solução salina; e c), grupo controle positivo, tratado com o estabilizador do humor Lítio (padrão-ouro).

Quadro 1. Protocolo Fase Mania.

PROTOCOLO FASE MANIA – 7 dias		
GRUPOS	Controle-salina	Solução salina por 7 dias.
	Anfetamina-salina	Administração de D-Anf por 7 dias.
	Anfetamina-lítio	Administração de D-Anf + Tratamento com Li por 7 dias.

Fonte: própria autora.

Quadro 2. Protocolo Fase Depressão.

PROTOCOLO FASE DEPRESSÃO – 21 dias		
GRUPOS	Controle-salina	Solução salina por 21 dias.
	Anfetamina-salina	Administração de D-Anf por 7 dias, seguido de 14 dias com apenas solução salina.
	Anfetamina-lítio	Administração de D-Anf + Tratamento com Li por 7 dias, seguido de 14 dias apenas com tratamento com Li.

Fonte: própria autora.

#### 4.4.1 Fase Mania

No protocolo da fase Mania, os animais receberam 7 dias consecutivos de tratamento com anfetamina (2,0 mg/kg). No sétimo dia, foram avaliados comportamentos tipo-maníaco por meio do Teste do Campo Aberto, Odor do Gato, Teste do Splash, Teste de Preferência por Sacarose e Teste do Nado Forçado.

Figura 2 - Esquema do protocolo Mania.

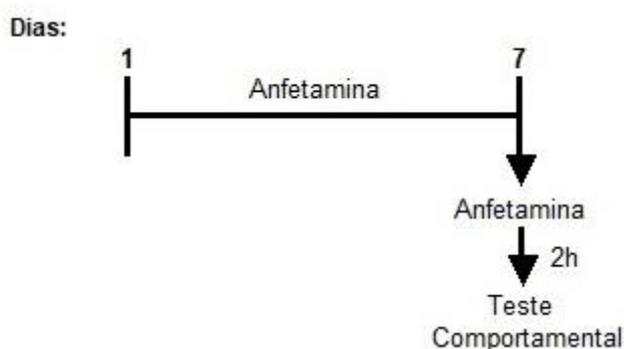


Figura 2: Esquema mostrando o desenho experimental dos testes comportamentais 7 dias após a administração ip de D-Anf em ratos, para avaliação de comportamento tipo-maníaco. N=8 por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

Para efeito de avaliação da validade preditiva nesta fase do modelo, um grupo de animais foi tratado com Lítio (47,5 mg/kg) a fim de se avaliar o efeito estabilizador do humor sobre as alterações induzidas pela administração repetida de D-anf por 7 dias, conforme esquema mostrado a seguir.

Figura 3 - Esquema do Protocolo Mania, tratamento com lítio.

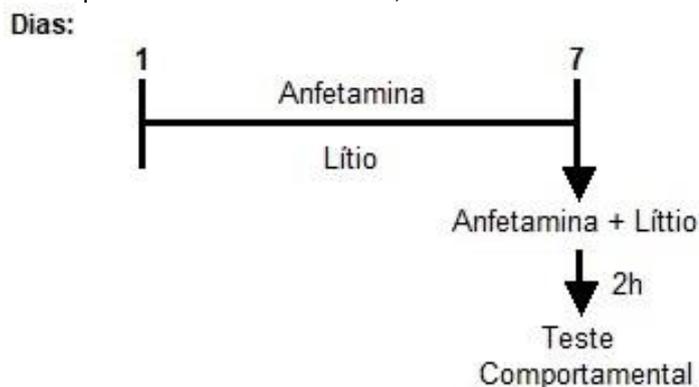


Figura 3: Esquema mostrando o desenho experimental dos testes comportamentais 7 dias após a administração concomitante de D-Anf e Li em ratos, para avaliação de tratamento do comportamento tipo-maníaco. N=8 por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4.2 Fase Depressão

Para o fenótipo depressivo, os animais receberam 7 dias de tratamento com D-anf (2,0 mg/kg). Do 8º até o 21º dia, os animais permaneceram sem administração de D-anf ou qualquer outra droga. No 21º dia foram avaliados comportamentos tipo-depressivo por meio do Teste do Campo Aberto, Teste do Splash, Teste de Preferência por Sacarose e Teste do Nado Forçado.

Figura 4 - Esquema do Protocolo Fase Depressão.

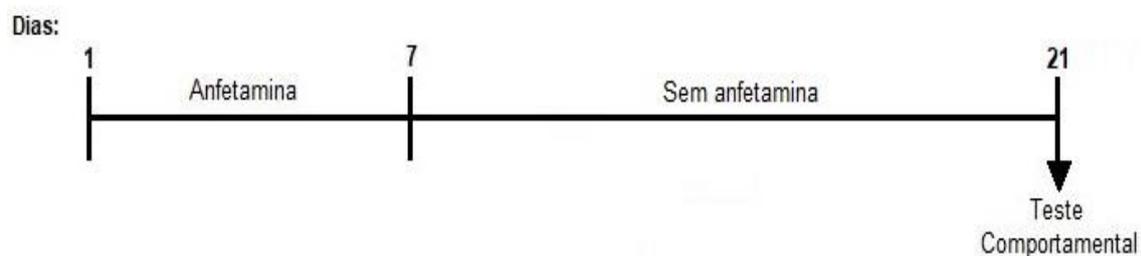


Figura 4: Esquema mostrando o desenho experimental dos testes comportamentais 14 dias após a suspensão do tratamento de 7 dias com administração ip de D-Anf em ratos, para avaliação de comportamento tipo-depressivo. N=8 por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

Para efeito de validação preditiva no protocolo da fase Depressão, um grupo de animais foi igualmente tratado com Lítio, a fim de se avaliar o efeito estabilizador do humor sobre as alterações induzidas pela administração repetida de D-anf por 7 dias, seguida da sua suspensão por 14 dias, conforme esquema mostrado a seguir (figura 5).

Figura 5 - Esquema do Protocolo Fase Depressão, com tratamento com Lítio.

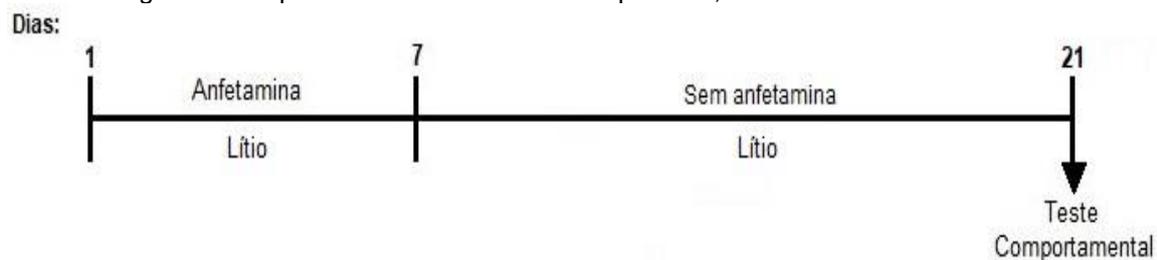


Figura 5. Esquema mostrando o desenho experimental dos testes comportamentais após 21 dias de tratamento com Li, e 14 dias após a suspensão do tratamento de 7 dias com administração ip de D-Anf em ratos, para avaliação de tratamento do comportamento tipo-depressivo. N=8 por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.5 Testes comportamentais

### 4.5.1 *Teste do Campo Aberto*

Os animais foram colocados em um campo aberto de acrílico, com área de 40 X 60 cm e piso dividido em nove quadrantes iguais (Figura 6). Os animais foram cuidadosamente colocados no centro do campo e foi permitido que eles explorassem livremente o cenário por 1 min (período de habituação). A atividade exploratória do animal foi registrada durante 5 minutos (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: o número de quadrados atravessados com as 04 patas pelo animal (*crossings*), que testa a atividade locomotora do animal; Número de entradas no quadrante central do campo aberto; e tempo no quadrante do meio da arena (parâmetro de ansiedade). Os experimentos foram realizados em uma sala de som atenuada, sob baixa intensidade de luz e com auxílio do soft comportamental *SMART video tracking* - Panlab.

Figura 6 - Teste Campo Aberto



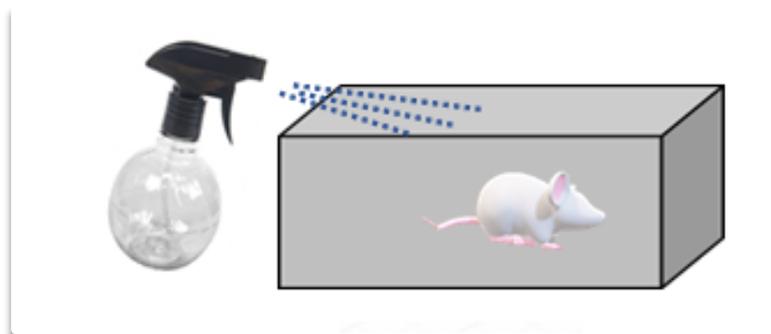
Fonte: (CUSTÓDIO, 2017)

#### 4.5.2 Teste do Splash

O teste de *Splash* avalia o comportamento de limpeza ou autocuidado do animal (YALCIN; AKSU; BELZUNG, 2005).

Este teste consiste em esguichar uma solução de sacarose a 10% no dorso do rato em sua gaiola. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose adere à pele e o animal inicia o comportamento de limpeza. Após a aplicação da solução de sacarose, foi registrada a latência, o tempo gasto na limpeza (*grooming*) e o número de *grooming* foi registrado por um período de 5 minutos como índice de autocuidado e comportamento motivacional (ISINGRINI et al., 2010).

Figura 7 - Teste do Splash

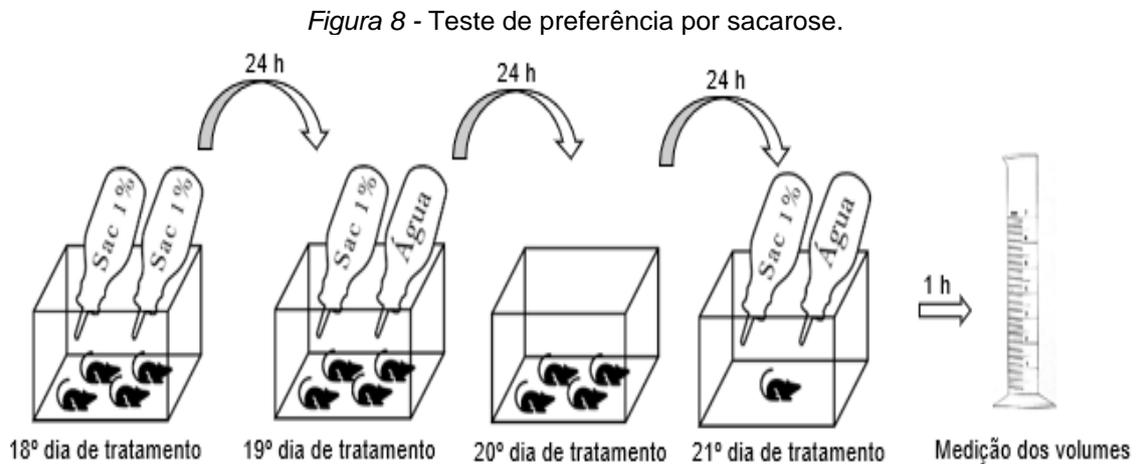


Fonte: (OLIVEIRA et al., 2017)

#### 4.5.3 Teste da Preferência por Sacarose

O teste de preferência por sacarose, conforme descrito por (MAO et al., 2010), é comumente usado para medir comportamento tipo-anedônico em animais experimentais. A anedonia refere-se à dificuldade de sentir prazer em atividades gratificantes ou agradáveis (LIU et al., 2018). Setenta e duas horas antes do teste os ratos foram treinados para se adaptar à solução de sacarose 1%: duas garrafas de solução de sacarose a 1% foram colocadas em cada caixa e 24 h depois uma garrafa com sacarose a 1% foi substituída por água da torneira durante 24 h. Após a aclimatação, os ratos foram privados de comida e água por

24 h. O teste de preferência por sacarose foi realizado às 9:00 horas. Os ratos foram colocados em caixas individuais e com acesso livre aos dois frascos contendo 100 ml de solução de sacarose 1% e 100 ml de água, respectivamente.



Fonte: OLIVEIRA et al, 2017.

Após 1 h, os volumes consumidos de solução de sacarose e água foram anotados e a preferência de sacarose foi calculada pela seguinte fórmula:

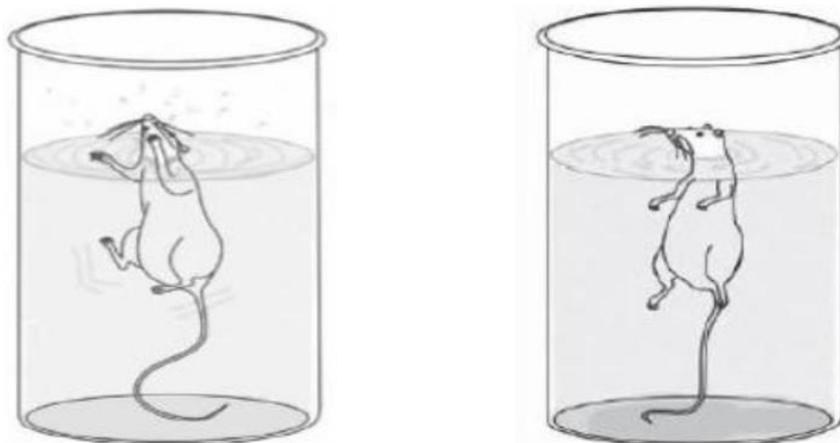
$$\text{Preferência pela sacarose} = \frac{\text{consumo de sacarose}}{\text{consumo de água} + \text{consumo de sacarose}} \times 100\%.$$

#### **4.5.4 Teste de Nado Forçado**

Os animais foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico contendo água em temperatura a 22-24°C, em quantidade suficiente para que não consiga apoiar suas patas no fundo. Após 1 minuto de habituação, o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais foi avaliado durante 5 minutos, em um tempo total de 6 minutos no interior do cilindro (figura 8). A imobilidade foi definida como a ausência de ação, fuga orientada e comportamentos tais como: natação, salto, cheiro ou mergulho. Um aumento na

duração da imobilidade é indicativo de um comportamento de tipo depressivo (PORSOLT et al., 1978).

Figura 9 - Ilustração do Teste de nado forçado



Fonte: QUEVEDO et al., 2013

#### **4.5.5 Teste de odor de gato**

O teste do odor do gato é um teste preditivo para comportamento de avaliação de risco e impulsividade, por isso foi avaliado apenas para a fase maníaca. Nesse teste, quatro parâmetros são avaliados: tempo e número de contatos com tecido com odor e tempo e número de entradas no abrigo.

Para verificar tal aspecto, foi utilizado o modelo de estímulo olfativo aversivo com o odor de gato. A metodologia empregada neste experimento foi adaptada de Andrews et al. (1993) e Zangrossi e File (1992). Os ratos foram expostos a duas condições de odor: de gato ou neutra. Todos os odores empregados neste experimento foram coletados em pedaços de tecidos (18 x 22 cm) retirados de uma mesma toalha de algodão. O odor de gato foi obtido esfregando vigorosamente por cinco minutos um pedaço de tecido contra os pelos de um gato doméstico (fêmea, sem raça definida). Esse procedimento foi realizado uma hora antes da sessão experimental. O tecido impregnado com o odor de gato foi mantido em um saco plástico vedado até o início dos

experimentos. Cada tecido com o odor de gato foi utilizado em apenas quatro sessões contínuas de exposição. Para o teste com o odor neutro, também foi utilizado um pedaço de tecido, só que sem contato com gatos. Os experimentos foram realizados em uma sala pequena com luz fraca e a exposição ao odor neutro procedeu à exposição ao odor de gato para evitar traços de odor de gato no grupo neutro. Antes da primeira exposição ao odor de gato, o pano impregnado foi deixado por dez minutos na sala teste. Os ratos foram expostos individualmente aos odores em gaiolas-moradia, contendo um tecido (com odor ou neutro) de um lado, e um recipiente plástico à guisa de abrigo, do outro. Para otimizar a avaliação, de forma a poder avaliar dois animais por vez, duas gaiolas-moradia foram colocadas lado a lado e um tecido com odor de gato foi colocado entre as duas gaiolas, na extremidade oposta aos compartimentos de abrigo. Cada sessão de exposição durou cinco minutos. Para cada rato, foram avaliados o número de vezes em que estes entraram em contato com o tecido (contato físico direto ou a partir de uma distância menor ou igual a cinco centímetros do tecido), o tempo gasto em contato com o tecido, o número de vezes em que os animais entraram no compartimento de abrigo, e o tempo gasto sob o abrigo (CUSTÓDIO, 2017).

Figura 10 - Teste do odor do gato (t = tecido impregnado com odor do gato; a=abrigo lado oposto)



Fonte: KIRSTEN, apud CUSTÓDIO (2017).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

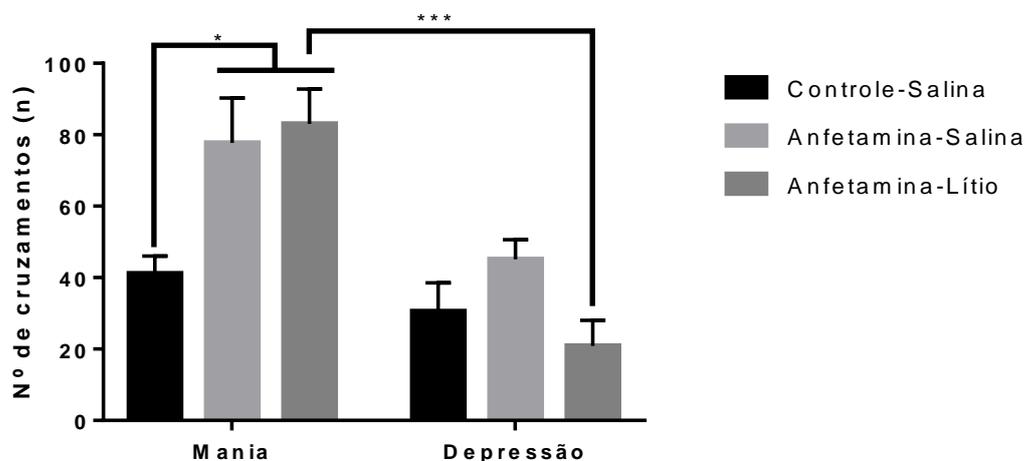
A análise dos dados foi realizada através do *software* GraphPad Prism, versão 7.0 para Windows. Os resultados paramétricos foram analisados através de *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey e não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns como teste *post hoc*. Valores significativos para as análises foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Campo Aberto - Atividade locomotora e Comportamento tipo-ansiedade

No teste do campo aberto, em relação ao número de cruzamentos, parâmetro relacionado à atividade locomotora geral do animal, nós observamos um efeito significativo de cada fator analisado isoladamente: “estado do humor” [F (1, 41) = 26.87;  $P < 0.0001$ ] e “tratamento farmacológico” [F (2, 41) = 5.144;  $P = 0.0102$ ], bem como da interação entre esses fatores [F (2, 41) = 4.382;  $P = 0.0188$ ]. No teste de comparações múltiplas, nós observamos um aumento no número de cruzamentos nos grupos tratados com D-ANF na fase maníaca (Anfetamina-Salina) e (Anfetamina-Lítio) comparado com o grupo Controle-Salina ( $P < 0.05$ ). Ademais, foi possível observar uma redução desse parâmetro no grupo Anfetamina-lítio da fase maníaca com o mesmo grupo na fase depressiva ( $P < 0.001$ ). Embora não significativo uma redução similar foi também observada no grupo Anfetamina-Salina comparando a fase depressiva com a fase maníaca.

Figura 11 - N° de cruzamentos, no Teste do Campo Aberto



Em relação aos parâmetros de exploração do centro: número de entradas e tempo no centro, não foi obtida nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. Apesar disso, uma tendência de aumento desses parâmetros é possível de ser notada no grupo Anfetamina-Salina comparado com o grupo Controle-Salina.

Figura 12 - N° de entradas no centro, no Teste do Campo Aberto

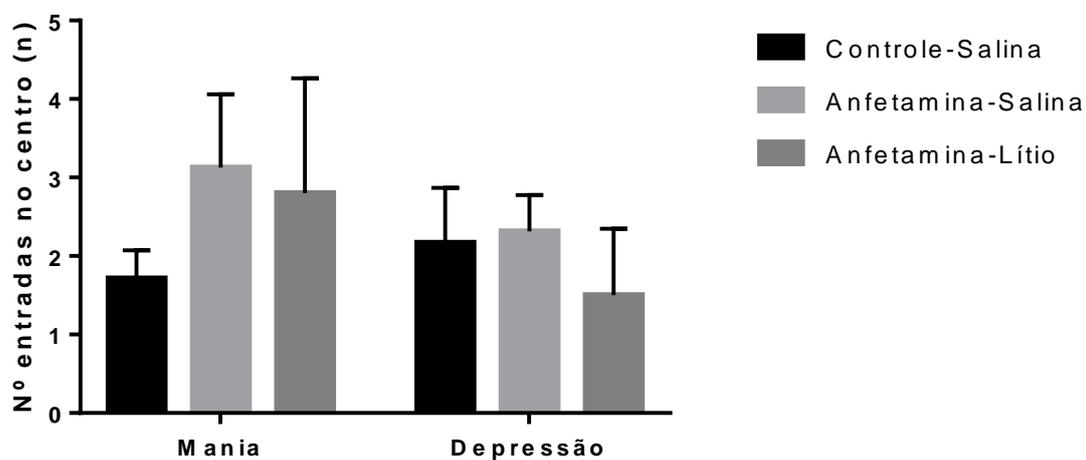
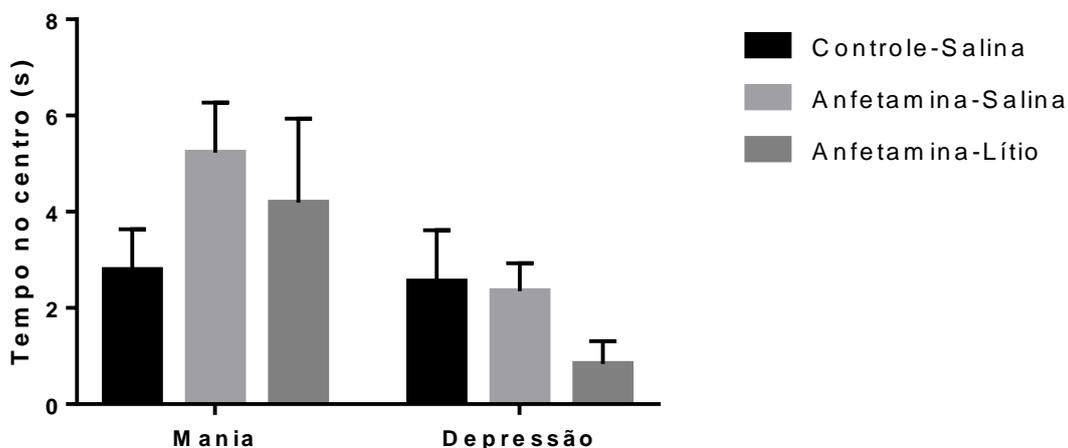


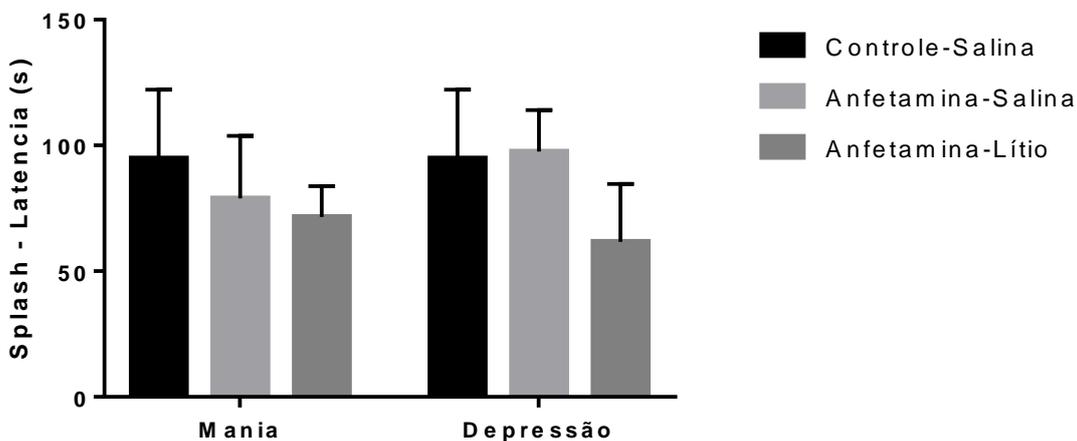
Figura 13 - Tempo no centro, no Teste do Campo Aberto



#### Teste do Splash – Auto-cuidado e motivação

Quanto à latência para início do comportamento de grooming, não foi diferença significativa entre os grupos analisados.

Figura 14 - Tempo de latência para início do comportamento de grooming, no Teste do Splash.



Em relação ao número de groomings, foi possível observar um efeito significativo do fator “fase do humor” [ $F(1, 53) = 4.841$ ;  $P = 0.0322$ ]. No teste de comparações múltiplas, foi possível observar um aumento desse parâmetro na fase maníaca no grupo Anfetamina-Salina comparado ao grupo Controle-Salina ( $P < 0.05$ ). Ademais, em relação ao tempo de grooming, a análise ANOVA revelou

um efeito significativo apenas do fator “tratamento farmacológico” [F (2, 44) = 7.211; P=0.0020]. No teste de comparações múltiplas, um aumento significativo desse parâmetro foi observado na fase maníaca no grupo Anfetamina-Salina comparado ao grupo Controle-Salina (P<0.05).

Figura 15 - Nº de groomings, no Teste do Splash.

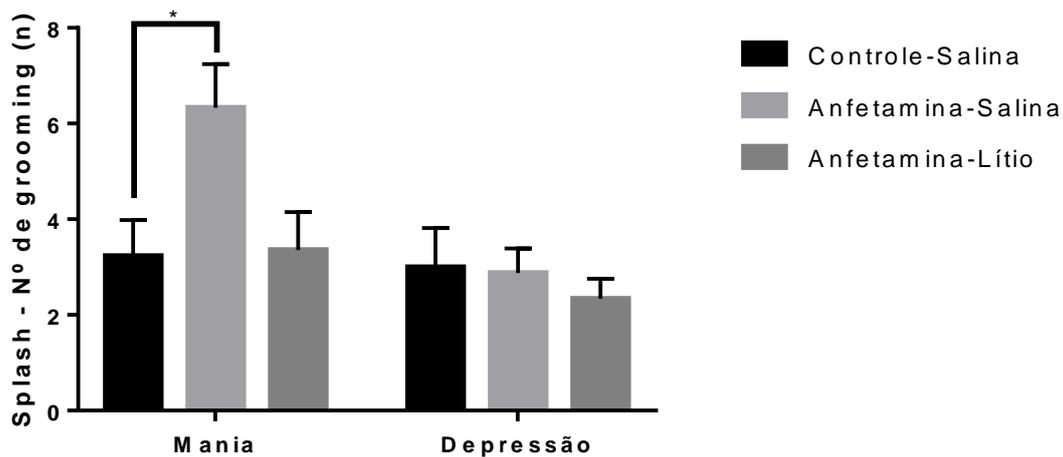
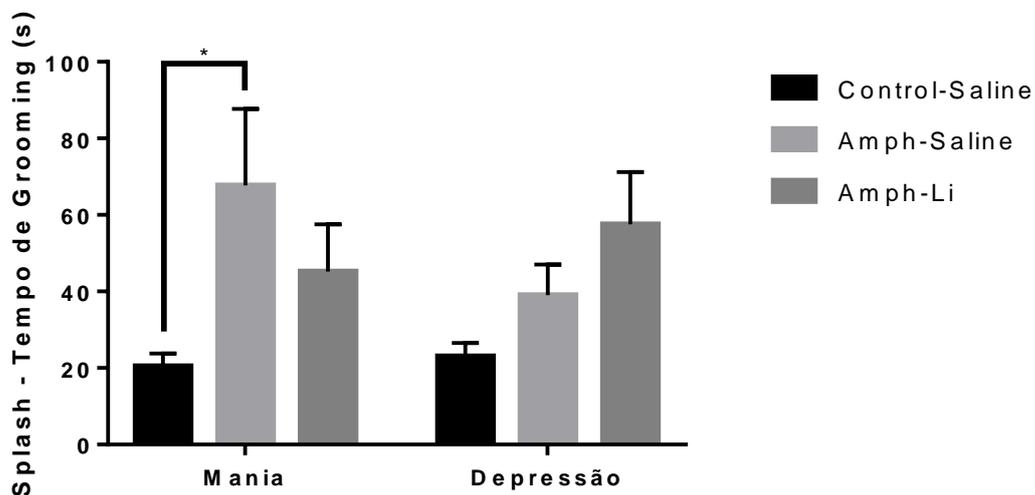


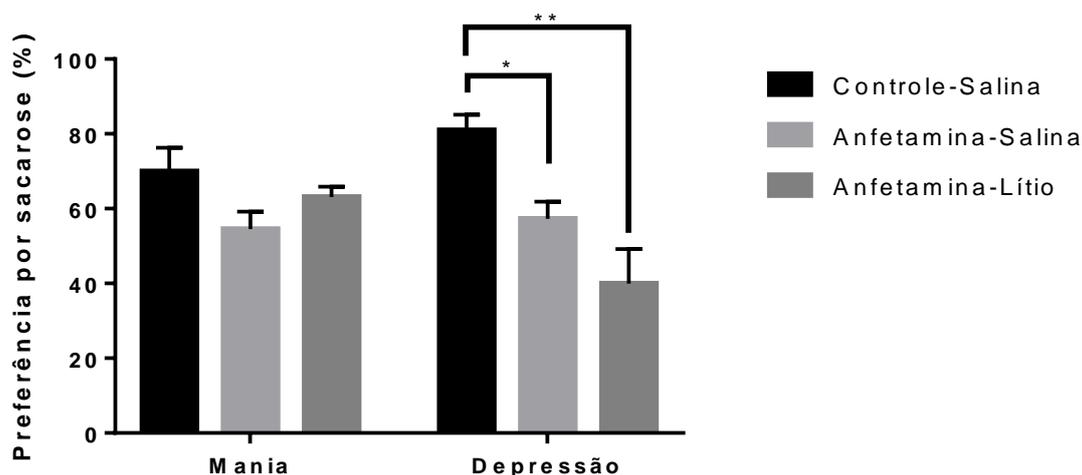
Figura 16 - Tempo de grooming, no Teste do Splash.



### Teste de Preferência por Sacarose – Anedonia e Comportamento Hedônico

A análise ANOVA revelou um efeito significativo do fator “tratamento farmacológico”  $F(2, 56) = 7.947$ ;  $P = 0.0009$ ] e da interação entre os fatores [ $F(2, 56) = 4.446$ ;  $P = 0.0161$ ]. No teste de comparações múltiplas, uma redução significativa no percentual de preferência por sacarose foi observada nos grupos tratados com D-Anf na fase depressiva Anfetamina-Salina ( $P < 0.05$ ) e Anfetamina-Lítio ( $P < 0.01$ ) comparado ao Controle-Salina. Na fase maníaca, não foram observadas diferenças significativas.

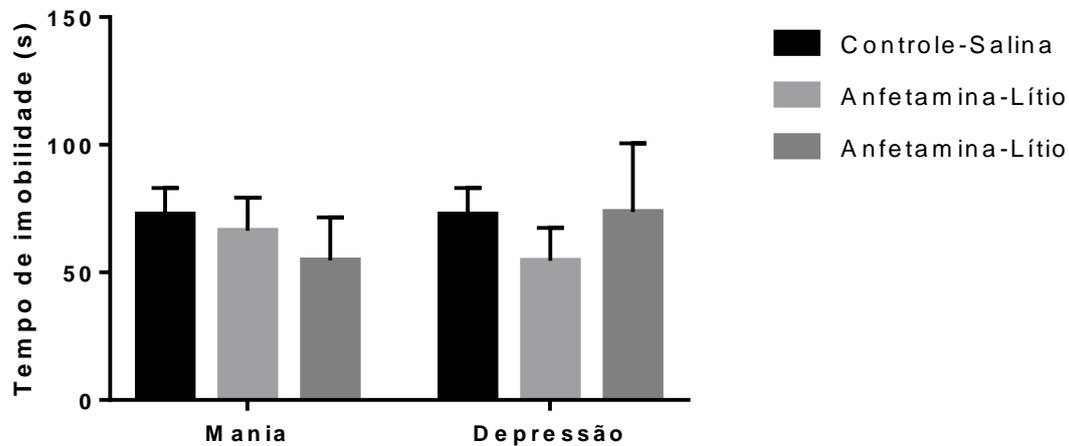
Figura 17 - Resultado do Teste de Preferência por Sacarose.



### Teste do Nado Forçado – Comportamento tipo-desespero

Não foram observadas diferenças significativas no tempo de imobilidade entre os grupos testados em nenhuma das fases do humor.

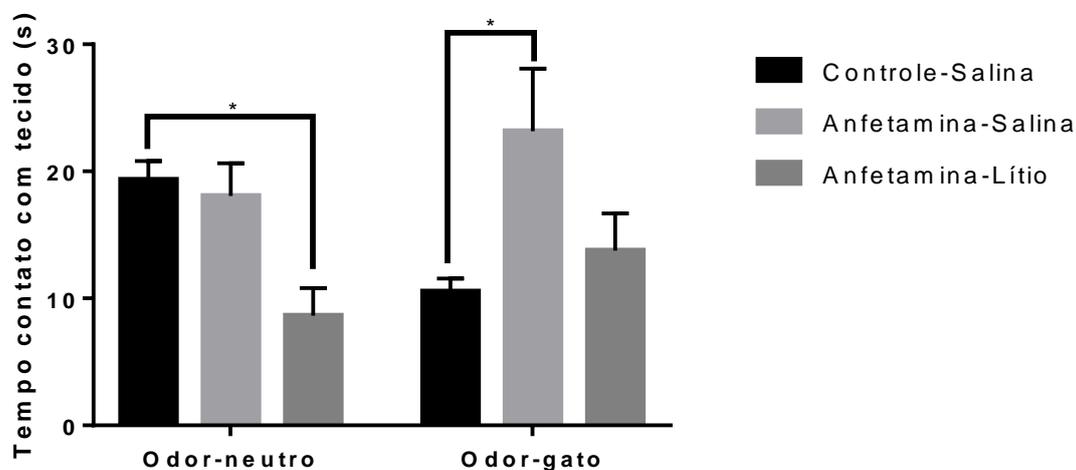
Figura 18 - Tempo de Imobilidade, no Teste de Nado Forçado.



#### *Odor do gato - Avaliação do risco e Impulsividade*

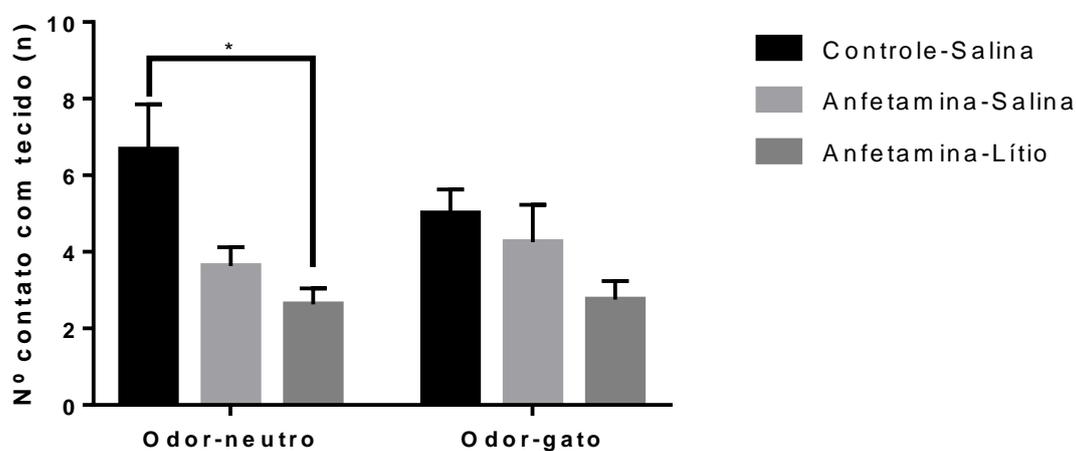
O teste do odor do gato é um teste preditivo para comportamento de avaliação de risco e impulsividade, por isso foi avaliado apenas para a fase maníaca. Nesse teste, quatro parâmetros são avaliados: tempo e número de contatos com tecido com odor e tempo e número de entradas no abrigo. Inicialmente, em relação ao tempo em contato com o tecido com odor, a análise ANOVA demonstrou um efeito significativo do fator “tratamento farmacológico” [ $F(2, 40) = 6.44$ ;  $P=0.0038$ ] e da interação entre os fatores [ $F(2, 40) = 5.155$ ;  $P=0.0102$ ]. No teste de comparações múltiplas, um aumento significativo foi observado entre o grupo Anfetamina-Salina comparado Controle-Salina ( $P<0.05$ ) nesse parâmetro. Na situação de odor neutro, o tratamento com Li (Anfetamina-Lítio) reduziu o tempo de contato com o tecido comparado ao grupo Controle-Salina ( $P<0.05$ ).

Figura 19 - Tempo de contato com o tecido neutro e com o tecido com odor de gato, no Teste do Odor do Gato.



Em relação ao número de contatos com o tecido, a análise ANOVA evidenciou efeito apenas do fator “tratamento farmacológico” [ $F(2, 45) = 8.668$ ;  $P=0.0007$ ]. No teste de comparações múltiplas, apenas uma redução no número de contatos com o tecido na situação neutra foi observada no grupo Anfetamina-Lítio comparado com o grupo Controle-Salina ( $P<0.05$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada na situação de exposição ao odor do gato para esse parâmetro.

Figura 20 - Nº de contato com o tecido neutro e com o tecido com odor de gato, no Teste do Odor do Gato.



Quanto ao tempo no abrigo, a análise ANOVA evidenciou efeito apenas do fator “tratamento farmacológico” [F (2, 45) = 7.034; P=0.0022]. No teste de comparações múltiplas, na situação de odor do gato, um aumento do tempo no abrigo foi observado no grupo Anfetamina-Lítio comparado ao grupo Controle-Salina (P<0.05). De forma semelhante, em relação ao número de entradas no abrigo, a análise ANOVA evidenciou efeito apenas do fator “tratamento farmacológico” [F (2, 42) = 14.23, P<0.0001], e no teste de comparações múltiplas, um aumento nesse parâmetro foi observado apenas no grupo Anfetamina-Lítio comparado ao grupo Anfetamina-Salina (P<0.01).

Figura 21 - Tempo do abrigo, no Teste do Odor do Gato.

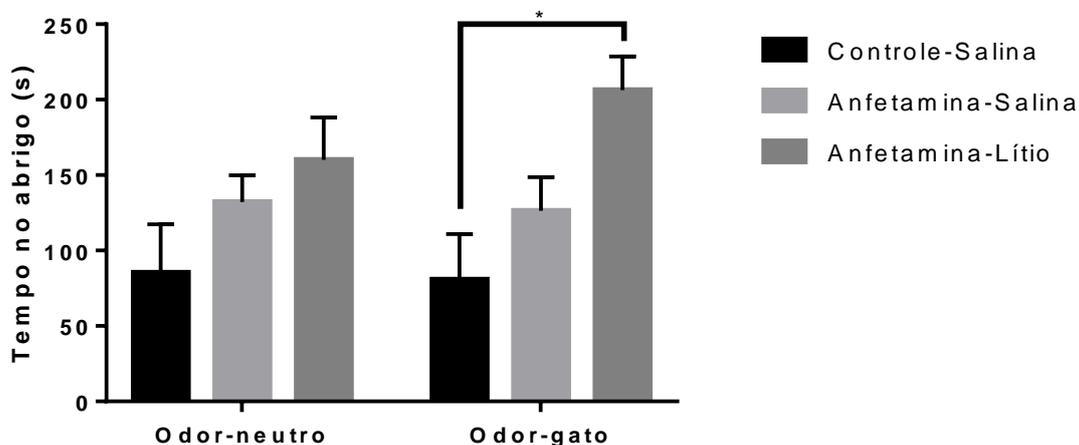
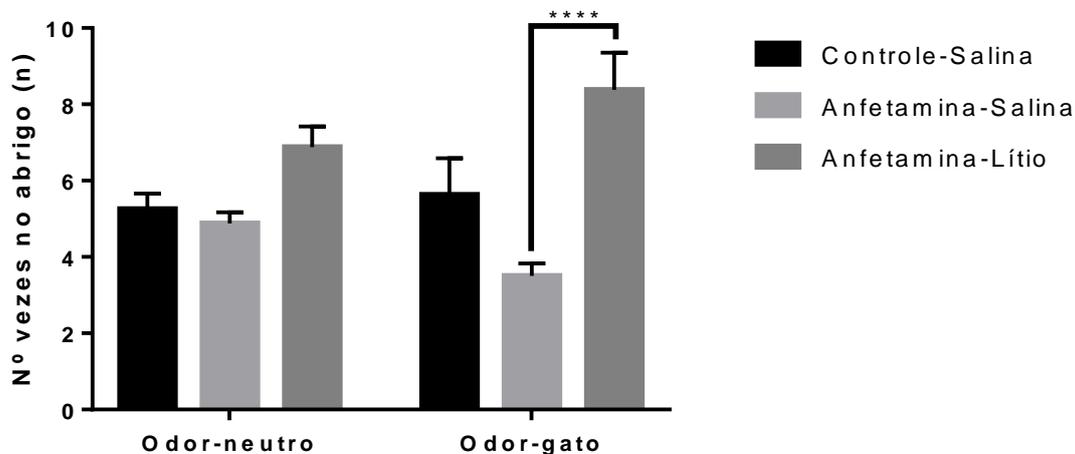


Figura 22 - Nº de vezes no abrigo, no Teste do Odor do Gato.



## 7 DISCUSSÃO

Há décadas os modelos animais vêm sendo utilizados na tentativa de melhor compreender os processos fisiopatológicos dos transtornos mentais, assim como para o desenvolvimento de alternativas farmacológicas. No entanto, ainda não foi possível reproduzir fielmente, nos animais, as características biopsicossociais de doenças humanas (NUNES; HALLAK, 2014). Mimetizar quadros psicopatológicos complexos, com alto teor de subjetividade clínica, como no caso do TB, permanece um desafio para os pesquisadores da área.

Não obstante, ainda que de forma limitada, é inegável a contribuição que os modelos animais têm trazido na identificação e estudo de alterações comportamentais tipo-mania e tipo-depressão, alterações bioquímicas e avaliação de efeitos de tratamentos psicofarmacológicos.

Um modelo animal de mania induzido por anfetamina possui dois protocolos, que são classificados devido à ordem de administração da droga e dos fármacos. Esses protocolos são denominados reversão ou prevenção (NUNES; HALLAK, 2014; QUEIROZ, 2017). O protocolo de reversão é projetado para reproduzir o mecanismo do tratamento de um episódio maníaco agudo. Já o protocolo de prevenção visa mimetizar a fase de manutenção do tratamento de TB (QUEVEDO, JOÃO; RESENDE, WILSON RODRIGUES; VARELA, 2014).

O modelo que propusemos trabalha com as duas fases do TB, em dois protocolos que mimetizam a Fase Mania e a Fase Depressão. No protocolo da Fase Mania, fizemos a administração repetida de D-Anf por 7 dias, seguido da avaliação comportamental. Já no protocolo Depressão, induzimos os sintomas tipo-depressivo administrando D-Anf por 7 dias e suspendendo sua administração pelos 14 dias seguintes, período ao final do qual realizamos igualmente a avaliação comportamental. O tratamento com Lítio foi introduzido no intuito de verificar a prevenção dos estados de mania e depressão, ou seja, tiveram o início concomitante da administração da droga (D-Anf) e do fármaco (Li).

Iniciamos a avaliação comportamental com o Teste do Campo Aberto, que avalia a Atividade exploratória-locomotora e Comportamento tipo-ansiedade, por meio onde os parâmetros observados foram o número de cruzamentos, o número de entradas e o tempo de permanência no centro do aparato. Naturalmente, os animais tendem a permanecer na região periférica do campo aberto. Em contrapartida, a curiosidade pelo novo ambiente cria um conflito entre a aversão do animal e o parâmetro buscador de novidade, estado semelhante ao da ansiedade. Deste modo, o aumento do tempo e frequência dos animais no centro do campo aberto é uma indicação de comportamento ansioso (CHOLERIS et al., 2001).

Nossos resultados mostraram que a administração de D-Anf causou hiper locomoção nos animais, um parâmetro do comportamento esperado para a fase de Mania (7 dias). Já o tratamento com Lítio, fármaco classicamente utilizado na prática clínica, não foi capaz de prevenir o aumento da atividade locomotora. Este fato pode ser justificado levando em consideração que, embora tenha havido administração concomitante de D-Anf e Lítio, no intuito de reproduzir um protocolo de manutenção (ou prevenção) existe diferença entre início de ação e equilíbrio da concentração das duas drogas (Anfetamina: início de ação de 2h; Lítio: 4-6 dias). Na fase de Mania, a eficácia do Li pode chegar a 70-80%. No entanto, há uma latência de resposta de aproximadamente 2 a 4 semanas (ZUNG; MICHELON; CORDEIRO, 2010). Numa revisão sobre modelo animal de mania publicada por Varela (2018) foi demonstrado um protocolo de manutenção com base na administração de Li, em modelo animal de mania induzido por anfetamina, onde o lítio foi capaz de prevenir o comportamento tipo-maníaco. Entretanto, o início do tratamento com o Li se deu após 7 dias antes da administração de anfetamina.

Quanto aos outros parâmetros analisados, o número de entradas no centro e tempo no centro, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. No entanto, observou-se uma discreta tendência de aumento desses parâmetros no grupo AMPH+SAL comparado com o grupo CTL SAL.

Outro teste comportamental utilizado neste estudo foi o Splash. Este teste é farmacologicamente validado e avalia o comportamento de limpeza (grooming) como uma forma de comportamento motivacional (ISINGRINI et al., 2010).

Nosso estudo não evidenciou diferença significativa na latência para início do grooming entre os grupos analisados. Já com relação ao número de groomings, observamos que, apenas na Fase Mania, houve um aumento deste parâmetro no grupo que recebeu administração de D-Anf, em comparação com o grupo Controle-Salina. Da mesma forma, também na Fase Mania, observamos aumento quanto ao tempo de grooming no grupo Anfetamina-salina, comparado ao grupo Controle-salina.

O grooming é um comportamento de autocuidado típico dos roedores e está relacionado à estimulação do receptor dopaminérgico D1 (KALUEFF et al., 2016). Com base nos nossos achados, acreditamos, portanto, que este resultado está relacionado à ação da anfetamina no receptor dopaminérgico.

Outro teste utilizado foi o Teste de Preferência - ou consumo - da Sacarose, que avalia o comportamento hedônico ou de anedonia. Anedonia é definida como uma incapacidade de sentir prazer e é um sintoma central da depressão, cujos mecanismos biológicos permanecem pouco compreendidos (TREADWAY; ZALD, 2012).

No nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas no percentual de preferência por sacarose na fase Mania. Já na fase Depressão, como se era de esperar, houve redução significativa do percentual de preferência da sacarose no grupo Anfetamina-salina, quando comparado ao grupo Controle-salina. Tal achado confirma a fundamentação da nossa hipótese de que a suspensão da anfetamina pode desencadear uma fase depressiva, por abstinência. Entretanto, o grupo tratado com lítio (Anfetamina-Lítio) também apresentou comportamento semelhante, ou seja, redução do consumo de sacarose. Segundo Stahl (2014), qualquer que seja o modo de atuação do lítio,

ele demonstra ser efetivo nos episódios maníacos e na manutenção das remissões e, talvez, dos episódios depressivos.

Vários estudos de modelo de depressão, tal como o induzido por corticosterona, evidenciam comportamento do tipo desamparo (OLIVEIRA et al., 2017; SILVA et al., 2013). O desamparo aprendido é avaliado principalmente por meio do teste do Nado Forçado, em que um aumento do tempo de imobilidade dos animais é indicativo de comportamento depressivo-símile (LUCKI, 1997, OLIVEIRA et al, 2017, SILVA et al, 2013). No nosso estudo, não foram evidenciadas alterações significativas neste teste.

Outro aspecto a ser considerado na avaliação comportamental, e bastante característico na mania, é o comportamento impulsivo com perda da avaliação de risco (SWANN et al., 2009). Tal comportamento pode ser avaliado por meio do teste do Odor do gato, e, portanto, foi avaliado apenas para a fase maníaca. Nesse teste, quatro parâmetros são avaliados: tempo e número de contatos com tecido com odor e tempo e número de entradas no abrigo.

Nossos resultados mostraram que houve aumento significativo do tempo de contato com o tecido com odor, por parte do grupo Anfetamina-salina, em comparação ao grupo Controle-salina. Já na situação de contato com o odor neutro, foi visto que o tratamento com Li (Anfetamina-lítio) reduziu tempo de contato com o tecido, comparado ao grupo Controle-salina. Os resultados também apontaram que houve redução do número de contato com o tecido no grupo Anfetamina-lítio, comparado ao grupo Controle-salina.

Um aumento do tempo no abrigo foi observado no grupo Anfetamina-lítio, comparado ao grupo Controle-salina, na situação de odor do gato. De forma semelhante, em relação ao número de entradas no abrigo, foi observado um aumento apenas no grupo Anfetamina-lítio, comparado ao grupo Anfetamina-salina.

Estes resultados mostram que a administração de anfetamina promove a manifestação da fase Mania do TB neste modelo, o que pode ser justificado por um desequilíbrio na transmissão dopaminérgica, visto que vários

estudos sugerem que no TB há uma desregulação da dopamina (BERK et al., 2007; QUEIROZ, 2017).

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O Transtorno Bipolar é uma doença grave e incapacitante e por este motivo vem sendo alvo de numerosas pesquisas, tanto no respeito à tentativa de melhor compreender os seus mecanismos fisiopatológicos, quanto para o screening de alternativas terapêuticas.

Contudo, a maioria das pesquisas ainda tem enfoque no desenvolvimento de modelos que estudam as duas fases de forma separada, o que limita, de alguma forma, a compreensão da progressão fisiopatológica da doença.

Nossa pesquisa se propôs a contribuir com o desenvolvimento de um modelo animal de transtorno bipolar que contempla as duas fases num só procedimento experimental. Para tanto, avaliamos o efeito da administração repetida de D-Anf, para mimetizar a fase Mania, e a suspensão desta mesma droga, a fim de causar um efeito depressor, provocado por uma desregulação da transmissão dopaminérgica.

Existem numerosos modelos que já são consagrados na literatura por mimetizarem a fase de mania, por administração de Anfetamina. Os nossos resultados corroboram com estas pesquisas, no que concerne também aos comportamentos do tipo-maníaco observados nos ratos.

Com relação ao protocolo da fase Depressão, apenas o teste de Preferência por Sacarose evidenciou comportamento tipo-depressivo. Cabe ressaltar que este é um teste com relevante peso para avaliação da depressão. Ainda assim, consideramos necessário o desenvolvimento de pesquisas que possam consolidar este modelo de duas fases para o estudo do modelo de Transtorno Bipolar.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico de transtornos mentais: DSM-V-TR**. [s.l.: s.n.]. v. 5
- ANDERSON, I. M.; HADDAD, P. M.; SCOTT, J. Bipolar disorder. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 345, n. December, p. 1–10, 2012.
- BERK, M. et al. Dopamine dysregulation syndrome: Implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 116, n. SUPPL. 434, p. 41–49, 2007.
- BOSAIPO, N. B.; BORGES, V. F.; JURUENA, M. F. Bipolar disorder: a review of conceptual and clinical aspects. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 50, n. supl1., p. 72, fev. 2017.
- CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, maio 2001.
- CUSTÓDIO, C. S. **DESAFIO IMUNE NEONATAL COM LIPOPOLISSACARÍDEO DESENCADEIA ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E IMUNOLÓGICAS/NEUROTRÓFICAS DURADOURAS RELACIONADAS AO SEXO E A IDADE EM CAMUNDONGOS: RELEVÂNCIA PARA O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.
- ISINGRINI, E. et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLOS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10404, 28 abr. 2010.
- KALUEFF, A. V et al. HHS Public Access. v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.
- KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. (ORG. . **Transtorno Bipolar - Teoria E Clínica**. 2. ed. [s.l.] Artmed, 2016.
- LIU, M.-Y. et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature Protocols**, v. 13, n. 7, p. 1686–1698, 2018.
- MAO, Q.-Q. et al. Long-term treatment with peony glycosides reverses chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior via increasing expression of neurotrophins in rat brain. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 2, p. 171–177, 11 jul. 2010.
- MUNEER, A. Mixed States in Bipolar Disorder: Etiology, Pathogenesis and Treatment. **Chonnam Medical Journal**, v. 53, n. 1, p. 1, 2017.
- NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: Avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, n. 3, p. 528–543, 2014.
- OLIVEIRA, T. DE Q. et al. Brain antioxidant effect of mirtazapine and reversal of

sedation by its combination with alpha-lipoic acid in a model of depression induced by corticosterone. **Journal of Affective Disorders**, v. 219, 1 maio 2017.

QUEIROZ, A. I. G. **MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO PELO INIBIDOR DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA GBR 12909: ESTUDO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS E PREVENÇÃO/REVERSÃO PELA MINOCICLINA**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

QUEVEDO, JOÃO; RESENDE, WILSON RODRIGUES; VARELA, R. B. Modelo animal de mania induzido por anfetamina como método de identificação de novos alvos terapêuticos para o transtorno bipolar. Artigo de Revisão. **Revista debates em psiquiatria**, 2014.

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, p. 685–695, 2013.

SWANN, A. C. et al. Increased trait impulsivity bipolar disorder. v. 11, n. 3, p. 280–288, 2009.

TREADWAY, M. T.; ZALD, D. H. Reconsidering Anhedonia in Depression. v. 35, n. 3, p. 537–555, 2012.

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.

VARELA, R. B. **EFEITOS DOS INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASE SOBRE ENZIMAS EPIGENÉTICAS NO CÉREBRO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELOS DE MANIA E DE DEPRESSÃO CRICIÚMA DEZEMBRO DE 2018**. [s.l.] UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, 2018.

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European Journal of Pharmacology**, v. 514, n. 2–3, p. 165–174, 9 maio 2005.

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