

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA

KATHERINNE MANRIQUE PERICO

Papel de SOCS2 nos comportamentos tipo maníaco e depressivo experimental: percepções das ações do tratamento com Zileuton como terapia experimental emergente para o transtorno bipolar.

Orientadora: Profa. Dra Fabiana Simão Machado

Coorientadora: Profa. Dra Aline Silva de Miranda

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA

KATHERINNE MANRIQUE PERICO

Papel de SOCS2 nos comportamentos tipo maníaco e depressivo experimental: percepções das ações do tratamento com Zileuton como terapia experimental emergente para o transtorno bipolar.

Orientadora: Profa. Dra Fabiana Simão Machado

Coorientadora: Profa. Dra Aline Silva de Miranda

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Belo Horizonte

2017

Agradecimentos:

Agradeço a Deus, à vida e ao Brasil que me acolheu e no que cresci como humana, mulher e cientista. À UFMG e ao programa de pós-graduação em bioquímica e imunologia. À CAPES e à Fump pela assistência estudantil.

Agradeço muito as minhas orientadoras Fabiana e Aline por ter me entregado sem reserva todos os recursos científicos e acadêmicos que me acrescentaram em diferentes aspectos e me conduziram. Obrigada à Fabiana pela oportunidade de fazer esta pesquisa e por ter me aberto as portas do LIDIN; à Aline pela dedicação e por tanto aprendizado.

À Fátima Brant pelo apoio incondicional como colega e amiga. Pela ajuda nos experimentos de mania. Os resultados de depressão em camundongo SOCS2^{-/-}, publicados por primeira vez nesta pesquisa, foram obtidos por ela durante seu doutorado.

Ao laboratório do professor Antonio Lúcio Teixeira, particularmente à Erica Viera pela colaboração nos ensaios de ELISA e CBA.

Aos laboratórios do professor Mauro Teixeira, de neuropsicofarmacologia do professor Fabrício Moreira, da professora Fabiola Ribeiro, do professor Sérgio Costa e dos professores Helton Reis e Antônio Pinheiro. Especialmente a Juliana Bastos e Isabela Olmo.

Aos meus amigos do LIDIN pelas discussões na pesquisa, o apoio e os risos: à Renata Monti, Melisa Gualdrón, Jacqueline Barbosa, Allyson Cramer, Diego Rodrigues, Cynthia Honorato, Paulo Leite, Pollyana Pimentel, Samuel Teixeira, Ana Rezende, Andréia Barroso e Lísia.

Ao Lucas Passos e sua família pelo carinho. Obrigada Lucas pelo apoio nos westerns blot!

Aos professores da banca examinadora Izabela Barbosa e Fabrício Moreira pela disponibilidade e colaboração para as melhoras deste trabalho.

À minha família e a todos meus amigos pela confiança e apoio.

RESUMO

A fisiopatologia do transtorno bipolar (TB) ocorre dada uma complexa interação no sistema neuroimunoendócrino de diferentes fatores gênicos, moleculares, celulares e ambientais. Ambos episódios, depressivo e maníaco, do TB foram associados com fatores imunoinflamatórios. Zileuton é um inibidor da enzima 5-lipoxigenase envolvida na produção de mediadores lipídicos pró e anti-inflamatórios como leucotrienos e lipoxinas, respectivamente. As lipoxinas modulam a expressão da proteína Supressor de Sinalização de Citocinas (SOCS) 2, que por sua vez, regula a sinalização de citocinas e fatores neurotróficos. Atualmente, não existe um modelo experimental que reproduza a oscilação de depressão para mania apresentada no TB. Porém, o comportamento tipo mania pode ser induzido por GBR 12909 (inibidor seletivo do transportador de dopamina), sendo um modelo de mania bem aceito. O papel de SOCS2 e eicosanoides no TB não é conhecido sendo a sua elucidação o objetivo principal desse estudo. Camundongos C57BL6 e deficientes para SOCS2 (SOCS2^{-/-}) foram administrados com GBR 12909 ou salina e tratados com Zileuton ou veículo. A presença de mania foi avaliada por análise de hiperlocomoção, durante 30 minutos; imediatamente ou 24 horas após a administração de GBR 12909. A expressão de SOCS2 e produção de citocinas e fatores neurotróficos foram avaliadas em diferentes regiões do cérebro utilizando Western Blotting, CBA (Cytometric Bead Array) e ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), respectivamente. Os resultados demonstraram que camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram um comportamento basal depressivo. O GBR 12909 induziu hiperlocomoção em animais selvagens e com atraso nos deficientes em SOCS2; a qual foi ainda apresentada nos deficientes, mas não nos selvagens, após 24 horas. Nossos resultados demonstraram menor expressão de SOCS2 no córtex pré-frontal de selvagens administrados com GBR 12909. Com a administração de GBR 12909, a deficiência de SOCS2 resultou no aumento de IL6, MCP1 e IL10 e redução de fatores neurotróficos (BDNF e GDNF). O tratamento com Zileuton após administração de GBR 12909, preveniu do episódio de tipo mania, e alterou os níveis de citocinas e fatores neurotróficos de forma dependente de SOCS2. Em conjunto, esses resultados sugerem que administração de GBR 12909 em SOCS2^{-/-}, pode ser um potencial modelo experimental para o estudo do transtorno bipolar e que Zileuton reduz a gravidade dos sintomas de mania experimental através da indução de SOCS2.

Palavras-chave: Transtorno bipolar, mania, depressão, SOCS2, eicosanoides, modelo animal.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) pathophysiology occurs because of a complex interaction in neuroimmunoenocrine system of genetic, molecular, cellular and environmental factors. Both episodes, depressive and manic, of BD were associated with immunoinflammatory factors. Zileuton is an inhibitor of the 5-lipoxygenase enzyme involved in the production of pro- and anti-inflammatory lipid mediators such as leukotrienes and lipoxins, respectively. Lipoxins modulate the expression of the protein Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 2, which, in turn, regulates the signaling of cytokines and neurotrophic factors. Currently, there is no experimental model reproducing the oscillation of depression to mania presented in TB. However, mania-like behavior can be induced by GBR 12909 (selective inhibitor of dopamine transporter), being a well-accepted model of mania. The role of SOCS2 and eicosanoids in TB is not known and its elucidation is the main objective of this study. C57BL6 (C57BL6) and SOCS2 Knock-out (KO) mice were administered with GBR 12909 or saline and Zileuton or vehicle, and the presence of mania was assessed by hyperlocomotion analysis immediately for 30 minutes or 24 hours after administration of GBR. The expression of SOCS2 and production of cytokines and neurotrophic factors were evaluated in different regions of the brain using Western Blotting, CBA (Cytometric Bead Array) and ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), respectively. SOCS2 KO mice presented a depressive basal behavior and when treated with GBR 12909, despite having a delayed mania response, they were not able to control the action of GBR; since in C57BL6 the hyperlocomotion is evident after 10 minutes of drug administration in SOCS2KO occurred only 25 minutes later and remained high up to 24 hours later. Our results demonstrated lower expression of SOCS2 in prefrontal cortex of the brain of GBR treated C57BL6 mice compared to untreated. Deficiency of SOCS2 resulted in increased IL6, IFN γ , MCP1, and IL10 and reduced neurotrophic factors (BDNF and GDNF). Treatment with Zileuton increased SOCS2 expression in the prefrontal cortex, but not in hippocampus, of the GBR-treated C57BL6, and reduced mania like behavior in these animals but not in SOCS2 KO. Taken together, these results suggest that administration of GBR in SOCS2 KO may be a potential experimental model for the study of bipolar disorder and that Zileuton reduces the severity of experimental mania symptoms by inducing SOCS2.

Key words: Bipolar disorder, mania, SOCS2, eicosanoids, animal model.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Soralbumina bovina (Bovine Serum Albumine)

Ca²⁺ – Cálcio

CCL – Quimiocina motivo C-C ligante / Chemokine (C-C motif) ligand

CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

CEUA – Comissão de Ética no uso de animais

COX – cicloxigenase

CYP – citocromo

DC – Célula dendrítica / dendritic cell

DNA – Ácido desoxiribonucleico.

DTT – Ditioneitol / *dithiothreitol*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético / *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA – Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

GABA – Ácido γ -aminobutírico.

GH – Hormônio do crescimento / groC57BL6h hormony

IFN γ – Interferão gama / Interferon gama

IGF1 – Fator de crescimento semelhante a insulina 1 / Factor groC57BL6h insulin 1

IL – Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

JAK – Janina quinase / Janus kinase

KCl – Cloreto de potássio

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LO – lipoxigenase

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – leucotrieno

LXA₄ – Lipoxina A₄

MC – Malária cerebral

M – Molar

μ L – Microlitro

mg – Miligrama

mM – Milimolar

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

NaF – Fluoreto de sódio / *Sodium Fluoride*

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NK – Célula Natural Killer

NMDA – N-metil-D-aspartato

NNT1 - neurotrofian1

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBMCs – Células mononucleares de sangue periférico

PbA – Plasmodium berghei ANKA

PBS – Tampão fosfato de sódio (Phosphate buffered saline)

PG – prostagla

PLA2 – fosfolipase A2

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo / *phenylmethylsulfonyl fluoride*

PPARs – proliferador de peroxissoma

r.p.m. – Rotações por minuto

SNC – Sistema Nervoso Central

SOCS – Proteína supressora da sinalização de citocinas / supressor of cytokine signalling

SOCS2^{-/-} – Camundongo deficiente para SOCS2

STAT – Sinais transdutores a ativadores de transcrição / signal transducers and activators of transcription)

TB – Transtorno bipolar / Bipolar disorder (BD)

Th – Células T auxiliaries / T helper cell

TLR – Receptores do tipo Toll / toll-like receptores

TNF – Fator de Necrose tumoral / Tumour necrosis fator

TP – receptor de tromboxano

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1. Biosíntese e sinalização de receptores de eicosanoides	30
Imagem 2. Representação ilustrativa nado forçado	36
Imagem 3. Representação ilustrativa do campo	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camundongos SOCS2 ^{-/-} não apresentam alteração motora no teste do nado forçado	42
Figura 2. Camundongos deficientes para SOCS2 apresentam comportamento do tipo depressivo em condições basais	43
Figura 3. Atividade locomotora em camundongos C57BL6	44
Figura 4. Efeito do GBR 12909 na expressão de SOCS2 no hipocampo de camundongos C57BL6	45
Figura 5. Efeito do GBR 12909 na expressão de SOCS2 no córtex prefrontal de camundongos C57BL6.	45
Figura 6. Deficiência de SOCS2 resulta em atraso para apresentar o comportamento de mania induzido por GBR 12909.....	46
Figura 7. O tratamento com zileuton depende de SOCS2 para reduzir o comportameto simulado de mania induzido por GBR 12909	47
Figura 8. Níveis de citocinas inflamatórias no comportamento induzido de mania por GBR 12909 em camundongos C57BL6 e SOCS2 ^{-/-} tratados com inibidor seletivo de 5-lipoxigenase (zileuton).....	49
Figura 9. Níveis de IL10 e MCP1 no comportamento induzido de mania por GBR12909 em camundongos C57BL6 e SOCS2 ^{-/-} tratados com inibidor seletivo de 5-lipoxigenase (Zileuton).	50
Figura 10. Papel de Zileuton na produção de fatores neurotróficos durante o comportamento simulado de mania por GBR12909 em camundongos C57BL6 e SOCS2 ^{-/-}	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. TRANSTORNO BIPOLAR.....	14
2.2. PERSPECTIVA HISTÓRICA.....	14
2.3. DIAGNÓSTICO.....	16
2.4. TRATAMENTO.....	17
2.5. A COMPLEXIDADE DO TRANSTORNO BIPOLAR.....	18
2.6. FISIOPATOLOGIA.....	19
2.6.1. Fatores Genéticos.....	19
2.6.2. Fatores Neuroanatômicos.....	20
2.6.3. Neurotransmissão.....	21
2.6.4. O eixo Hipotálamo – Pituitária – Adrenal (HPA).....	22
2.6.5. Estresse oxidativo e metabólitos do triptofano.....	22
2.7. FATORES NEUOTRÓFICOS E CITOLOGIA NEURONAL.....	24
2.8. INFLAMAÇÃO NO TRANSTORNO BIPOLAR.....	26
2.9. RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO TRANSTORNO BIPOLAR.....	28
2.9.1. Supressor da Sinalização de Citocinas (SOCS) 2.....	28
2.9.2. Lipoxinas e 5-lipoxigenase.....	30
2.10. MODELOS ANIMAIS.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. ANIMAIS.....	35
4.2. FÁRMACOS E TRATAMENTOS.....	35
4.2.1. GBR 12909.....	35
4.2.2. Zileuton.....	35
4.3. MODELO ANIMAL PARA TRANSTORNO BIPOLAR.....	35
4.3.1. Testes de depressão: Nado forçado.....	36
4.3.2. Modelo animal de Mania.....	3736
4.4. WESTERN BLOT.....	38
4.4.1. Preparo de homogenato de cérebro de camundongo.....	38
4.4.2. Electroforese.....	38
4.4.3. Transferência úmida e ligação anticorpos.....	39
4.4.4. Revelado.....	39
4.5. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE NEUOTROFINAS E CITOCINAS POR ELISA E CBA.....	40
4.5.1. Preparo de homogenato de cérebro de camundongo.....	40
4.5.2. Tampão de extração de citocinas.....	40
4.5.3. Determinação da concentração de citocinas por CBA.....	41
4.5.4. Determinação da concentração de fatores neurotróficos por ELISA.....	41
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA SOCS2 APRESENTAM COMPORTAMENTO BASAL DEPRESSIVO.....	42
5.2. A ADMINISTRAÇÃO DE UMA ÚNICA DOSE DE GBR12909 INDUZ EPISÓDIO AGUDO DE MANIA EM CAMUNDONGOS SELVAGENS.....	43
5.3. EXPRESSÃO DE SOCS2 NO HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS C57BL6 APÓS INDUÇÃO DE EPISÓDIO AGUDO DE MANIA POR GBR12909.....	44
5.4. INDUÇÃO DE EPISÓDIO DE MANIA POR GBR 12909 EM CAMUNDONGOS SOCS2 ^{-/-}	45

5.5. EFEITO DO ZILEUTON NO EPISÓDIO DE MANIA INDUZIDO POR GBR 12909 EM CAMUNDONGOS SELVAGENS E DEFICIENTES PARA SOCS2	46
5.6. MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E FATORES NEUROTRÓFICOS POR SOCS2 E ZILEUTON EM REGIÕES DO SNC ASSOCIADAS AO TB.....	47
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	60
8. PERSPECTIVAS	61
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

O transtorno bipolar (TB) é uma condição psiquiátrica complexa e crônica, que ocorre com flutuações do humor entre depressão e mania; e cuja gravidade e frequência aumentam com o tempo (American-Psychiatric-Association, 2013). Na população constitui uma das 20 principais doenças, associada a longos períodos de incapacidade (WHO, 2008), que acarreta importantes prejuízos funcionais e cognitivos; e diversas comorbidades, como por exemplo ansiedade, epilepsia, transtornos de tireoide, doenças cardiovasculares, autoimune-alérgicas e diabetes mellitus (Lala SV, 2012), com impacto significativo na qualidade de vida (Gutierrez-Rojas L, 2008).

No TB há evidências do envolvimento de fatores genéticos, moleculares e celulares associados ao sistema neuroimunoendócrino, bem como de condições ambientais; que em associação, promovem uma perturbação da neurotransmissão, da neuroplasticidade e de aspectos neuroanatômicos nos indivíduos bipolares (Schloesser RJ, 2008, Maletic V, 2014). Diferentes pesquisas têm demonstrado a nível celular, algumas alterações neuro-gliais, que envolvem perda/atrofia celular, e ocorrem com afetação da neuroplasticidade e dos níveis de fatores neurotróficos; assim como no perfil de células imunes, na liberação de citocinas por células mononucleares estimuladas, entre outras relativas a uma resposta imuno-inflamatória, que envolve exacerbação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Manji HK, 2000, Schroeter ML, 2010, Barbosa IG, 2014). Porém os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia do TB não estão completamente elucidados, o que dificulta a identificação de potenciais alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos.

Ainda se desconhece a relação de causa ou efeito do processo de exacerbação dos níveis de citocinas nesta doença. Porém, estes níveis dependem de mecanismos de regulação biológica como os desempenhados pelas proteínas da família Supressor da Sinalização de Citocinas (SOCS). Por sua vez a atividade destes reguladores, particularmente de SOCS2, em processos de resolução da inflamação tem sido estudado em contextos como a atividade anti-inflamatória de lipoxinas induzidas por aspirina (ATL) (Machado FS. 2006), mas ainda se desconhece se existe alguma relação entre SOCS2 e os níveis de citocinas no TB e seu papel nesta doença.

Essa relação entre SOCS2 e a atividade anti-inflamatória dos eicosanoides lipoxinas, que são sintetizados pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO,) tem grande relevância como plausível estratégia de regulação de mediadores inflamatórios no TB. Assim, nesta pesquisa

visa-se uma aproximação ao estudo do papel de SOCS2 e da enzima 5-LO nos comportamentos maníaco e depressivo experimental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. TRANSTORNO BIPOLAR

O transtorno bipolar (TB) é uma doença psiquiátrica crônica e incapacitante, caracterizada por significativas alterações do humor e da atividade. Os diferentes estados de humor no TB são mania, hipomania e depressão, que podem ser apresentados ao mesmo tempo durante o estado misto, sendo a eutímia o estado de humor em ausência de todos os anteriores (American-Psychiatric-Association, 2013).

Clinicamente, a mania é caracterizada por elevação, expansão ou irritabilidade do humor de forma anormal e persistente, além de hiperatividade e insônia. A hipo-mania é um estado de mania de gravidade menor. Já a depressão bipolar caracteriza-se, dentre outros, pelos sentimentos de tristeza, vazio, isolamento social e pensamentos de morte recorrente. Apesar dos episódios de depressão serem mais frequentes durante o curso da doença, a mania é a característica principal do TB sendo o diagnóstico baseado na ocorrência de pelo menos um episódio de mania ou hipomania ao longo da vida (American-Psychiatric-Association, 2013).

A prevalência na população mundial está entre 0.1% a 4.4%, de acordo com o país (Merikangas, et al., 2011), com o primeiro episódio ocorrendo durante a adolescência ou na fase de adulto jovem, entre 15 e 24 anos (Perlis et al., 2009; Bauer et al., 2010). Embora sua prevalência seja inferior àquela relatada para outros transtornos mentais, como depressão maior (prevalência 3 vezes superior) e ansiedade (prevalência 6 vezes superior) (Kessler et al., 2005), o TB ocorre com importantes prejuízos funcionais e cognitivos, diversas comorbidades (Lala SV, 2012), com impacto significativo na qualidade de vida (Sierra et al., 2005; Gutierrez-Rojas et al., 2008; Shippee et al., 2011; Solé et al., 2012; Barbosa et al., 2013). Estima-se que o risco de suicídio em pacientes com TB é de 5 a 17 vezes maior (Bostwick JM et al., 2000), ocorrendo em 10 a 20% dos casos (Novick et al., 2010; Undurraga et al., 2012). Portanto, o TB está associado a um significativo impacto clínico e socioeconômico (Kupfer, 2005).

2.2. PERSPECTIVA HISTÓRICA

O TB é uma das doenças já descritas na antiguidade. A evolução do termo deve-se aos médicos, começando com Areteu da Capadócia no século I d.C, seguidor da doutrina hipocrática, foi o primeiro a descrever dois estados de humor opostos, melancolia e mania,

como duas imagens da mesma doença. Porém, o conceito moderno, que reconhece a depressão e a mania como episódios da mesma doença, surgiu na França com Falret (1851); descrevendo pela primeira vez, com o nome de *'folie circulaire'*, um transtorno mental caracterizado por um ciclo contínuo de depressão, mania e intervalos sem sintomas de duração variada. Na mesma época, Baillarger (1854) propôs um outro conceito sob o nome de *'folie à double form'*, o qual se contrapunha ao do Falret, defendendo que o intervalo entre mania e melancolia não era importante (Angst J, 2001).

Os dois conceitos foram amplamente difundidos na França e em outros países da Europa, notadamente nos germano-falantes. Karl Kahlbaum, que defendia o conceito do Falret, em 1863 denominou a doença como *"circulares Irresein"* (doença mental circular), conceito o qual embora enfrentasse alguns opositores, dez anos depois, já era de completa aceitação, inclusive em outros países como nos Estados Unidos. Em 1915, com o considerado fundador da psiquiatria moderna Emil Kraepelin, a denominação começou a ser conhecida como doença maníaco-depressiva (*manic-depressive insanity*), unificando todos os transtornos afetivos neste conceito, apresentando dicotomias como psicoses "endógenas" que viravam "demência precoce" e "doença maníaco-depressiva". Entretanto este conceito foi reconhecido como "fraco e limitado" pelo próprio Kraepelin (Angst J, 2001).

Nesse contexto, outros médicos alemães começaram a expandir de novo o conceito, como Carl Wernicke (1900), que defendeu que episódios isolados de mania e de melancolia eram diferentes de doença mental maníaco-depressiva. Depois Karl Kleist (1911) diferenciou entre transtornos afetivos unipolares ("einpölig") e bipolares ("zweipölig") e Karl Leonhard (1957) adicionou distintas e complexas classificações (Angst J, 2001).

Finalmente, o conceito de TB surgiu em 1966 com duas publicações, uma na Suíça e a outra na Escandinávia pelos médicos Jules Angst e Carlo Perris, respectivamente. O conceito de TB continua em desenvolvimento, tentando ajustar-se às variadas e complexas manifestações com que o TB se apresenta na população. Dessa forma, Angst (1978) propuseram seis distinções para o transtorno bipolar e outros médicos, como o estadunidense Akistal as denominaram como "espectro bipolar". A edição de 2013 do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) separou o TB e os transtornos relacionados (transtorno ciclotímico, transtorno bipolar induzido por substâncias/medicação, transtorno bipolar devido a outras condições médicas, outros transtornos bipolares e transtorno bipolar não específico), dos transtornos depressivos (American-Psychiatric-Association, 2013). A perspectiva histórica reflete a complexidade do TB, cujo diagnóstico adequado pode demorar até 10 anos após a manifestação dos primeiros sintomas (Rapoport S I, 2014).

2.3. DIAGNÓSTICO

As discussões dos conceitos anteriormente mencionados serviram de fundamento para a classificação atual descrita pelo DSM- 5 e pela Revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10).

Segundo o DSM-5, o TB do tipo I representa o clássico conceito maníaco-depressivo, reconhecido como psicose afetiva durante o século XIX. O diagnóstico atual requer que o indivíduo apresente mania durante pelo menos 1 semana, ou um tempo menor se a hospitalização for necessária (American-Psychiatric-Association, 2013). Difere do conceito clássico no qual sintomas de psicose ou de depressão eram diagnosticados. Entretanto, os episódios de depressão são frequentes na maior parte das pessoas que apresentam a totalidade dos sintomas de mania (American-Psychiatric-Association, 2013).

O diagnóstico de TB do tipo II é caracterizado por um ou mais episódios de depressão (com duração de duas semanas no mínimo) e de pelo menos um de hipomania (com duração de pelo menos 4 dias). Apresenta gravidade similar ao TB do tipo I, devido à quantidade de vezes que os indivíduos apresentam depressão e o significativo prejuízo das atividades sociais associadas a instabilidade do humor no tipo II (American-Psychiatric-Association, 2013). De forma interessante, o TB do tipo II não existe na classificação do CID-10 e só trata o TB de forma única sem classificação entre I ou II (Karanti A et al., 2016).

O diagnóstico de TB é complexo e heterogêneo, pois apresenta características comuns à outras psicopatologias como o transtorno depressivo maior e à esquizofrenia. Neste cenário, um diagnóstico pode se limitar por vários anos a uma classificação intermediária, conhecida como transtorno esquizo-afetivo ou a uma categoria de “não especificado” (Muneer A, 2016). O diagnóstico não adequado influencia significativamente a tomada de decisão clínica e a eficácia do tratamento, aumentando assim a morbimortalidade e o risco de suicídio. Outras comorbidades psiquiátricas que também interferem no diagnóstico e tratamento do TB, incluem o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (*attention deficit hyperactivity disorder - ADHD*), além dos transtornos de ansiedade, personalidade, alimentação e uso de substâncias psicoativas (McIntyre RS et al., 2008, McIntyre RS et al., 2014, Maletic V and Raison C, 2014).

Importantes esforços na tentativa de melhorar a caracterização e prevenção do TB têm sido feitos. Nesse contexto, a pesquisa de marcadores biológicos associados especificamente ao TB, que permitam diferenciar essa condição de doenças com sintomatologia similar está em ampla expansão nas últimas décadas (Teixeira AL et al., 2013, Rolstad S et al., 2015).

Entretanto, a complexidade biológica e clínica do TB tem dificultado a completa elucidação da fisiopatologia do TB bem como a identificação de potenciais biomarcadores e o desenvolvimento de novos fármacos.

2.4. TRATAMENTO

O tratamento do TB tem se baseado principalmente em terapias farmacológicas e psicológicas. Os estabilizadores de humor, em especial o lítio, têm sido amplamente indicados, embora nem todos os pacientes respondam efetivamente a esse tratamento. De maneira geral, os estabilizadores de humor propostos como terapia para o TB são descobertos de forma aleatória, uma vez que têm indicações iniciais para outras condições como psicoses e epilepsia. Dentre os antipsicóticos podemos citar a quetiapina, a olanzapina e o aripiprazole e os principais antiepiléticos são o valproato, a carbamazepina e a lamotrigina (Karanti A et al., 2016).

O lítio é ainda o tratamento de primeira linha, em forma de sais como carbonato de lítio, citrato de lítio e orotato de lítio, e foi inicialmente usado com sucesso para o tratamento de gota (Shorter E, 2009). Seu uso na psiquiatria começou aproximadamente em 1879, entretanto, não existem referências de seu uso durante a primeira metade do século XX. Foi reintroduzido na psiquiatria por John Cade em 1949 e aprovado pela Food and Drugs Administration (FDA) em 1970, para tratamento de mania (Shorter E, 2009). O mecanismo de ação do lítio, como estabilizador de humor não é conhecido; embora existam alguns mecanismos sugeridos, como a interação com transportadores neuronais de cátions monovalentes e bivalentes, a regulação dos receptores para glutamato e para serotonina, assim como a inibição da enzima glicogênio sintase quinase - 3 (glycogen synthase kinase - GSK-3) (Alda M, 2015).

O desenvolvimento de novos fármacos, específicos para o TB, tem sido dificultado pelo menos em parte pela não completa elucidação dos processos fisiopatológicos associados a essa condição. O segundo obstáculo é que não existe um modelo animal, que reproduza a sintomatologia, particularmente a oscilação entre mania e depressão, dificultando assim o estudo dos mecanismos fisiopatológicos e dos efeitos de novas estratégias terapêuticas.

2.5. A COMPLEXIDADE DO TRANSTORNO BIPOLAR

O estudo da fisiopatologia do TB ainda não é completo. Há evidências do envolvimento de fatores genéticos, moleculares e celulares associados ao sistema neuroimunoendócrino, bem como de condições ambientais, que em associação, promovem uma perturbação da neurotransmissão, da neuroplasticidade e de aspectos neuroanatômicos nos indivíduos bipolares (Schloesser RJ, 2008, Maletic V, 2014). Estudos sugerem que o TB surge especificamente da desregulação de importantes vias bioquímicas, com alteração na sinalização de glicocorticoides, aumento do estresse oxidativo, alteração no metabolismo do triptófano, perturbação do *turnover* (degradação e reposição) de fosfolipídios e desequilíbrio da resposta imune (Muneer A, 2016). Nesse contexto, o TB resulta em significativos prejuízos cognitivos, endocrinológicos, autonômicos e imunológicos (Phillips ML, 2006, Barbosa IG, 2013a)

O comprometimento de múltiplos sistemas biológicos, os processos fisiopatológicos e as consequentes manifestações se modificam ao longo do tempo durante o curso da doença. Assim, o TB manifesta-se de forma distinta na juventude, na fase adulta e na senescência. Diferente de outras doenças psiquiátricas, no TB ocorre a oscilação de duas condições opostas, mania e depressão; que apresentam variações em relação à frequência e duração de cada episódio. Essas variações podem ser observadas entre os pacientes e inclusive no mesmo paciente, podendo ter quase um número infinito de combinações de sintomas no TB (Maletic V and Raison C, 2014).

O significativo impacto clínico e socioeconômico reforça a necessidade de um conhecimento mais profundo dos processos gênicos, moleculares e celulares envolvidos no TB (Maletic V and Raison C, 2014). Nesse sentido, recentemente o Instituto Nacional de Saúde Mental (National Institute of Mental Health – NIMH) dos Estados Unidos propuseram o uso de critérios de domínio de pesquisa (Research Domain Criteria - RDoC). Os critérios de domínio são considerados processos avaliados na psiquiatria, como cognição, modulação do sono, processos sociais, dentre outros, para serem estudados, em modelos animais, como domínios em diferentes níveis incluindo comportamentais, moleculares, celulares e genéticos. (Cosgrove VE et al., 2016). A importância disto é que oferece uma abordagem direcionada das pesquisas na compreensão de doenças complexas como o TB.

2.6. FISIOPATOLOGIA

2.6.1. Fatores Genéticos

A herdabilidade no TB encontra-se entre 80% a 85% (Bienvenu OJ, 2011). O risco genético não se encontra distribuído aleatoriamente no genoma mas corresponde a rotas funcionais definidas. Estudos de associação do genoma completo (genome-wide association study – GWAS), encontraram risco genético em termos de polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism – SNPS) para as vias de sinalização do hormônio liberador de corticotrofina, de sinalização cardíaca β -adrenérgica, da sinalização de fosfolipase C, de sinalização do receptor NMDA de glutamato, de sinalização de endotelina-1 e de sinalização de hipertrofia cardíaca (Nurnberger JI Jr et al., 2014, Maletic V and Raison C, 2014).

Adicionalmente por GWAS tem se estabelecido uma similaridade genética maior do TB com esquizofrenia do que com o transtorno de depressão maior (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013). Além disso, 5 vias biológicas associadas ao TB foram sugeridas por GWAS, estas incluem a sinalização de dopamina regulada por glutamato e a remodelação do citoesqueleto por mediação adrenérgica (Torkamani A, 2008). Assim como existem evidências da superexpressão de genes associados a inflamação como *IL6* (interleucina 6), *TNF* (*tumour necrosis factor*), *PTGS2* (*prostaglandin-endoperoxide synthase*), e *PTX3* (*Pentraxin-related protein*) (Padmos RC, 2009).

Outros estudos demonstraram polimorfismo de genes associados à regulação do ciclo circadiano, como os *CLOCK* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) (Shi J et al., 2008), assim como de genes que codificam para receptores, transportadores e enzimas de síntese e catálise de monoaminas, como a catecol O-metiltransferase (COMT) (BK, 2012), monoamina oxidase (MAO), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (5HTT), triptófano hidroxilase (TPH2), bem como receptores de dopamina (D2 e D4) e de serotonina (5HT4 e 5HT2A) (Barnett JH and Smoller JW, 2009, Serretti A and Mandelli L, 2008).

O polimorfismo no gene para o fator neurotrófico BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) no TB foi associado com a gravidade da doença, com o início prévio na adolescência, a propensão de oscilação rápida e ao prejuízo da cognição e da execução de atividades. (Geller B, 2004, Vincze I, 2008). Outro gene associado com a etiologia do TB, é o *GSK3* para a enzima glicogênio sintase quinase 3, uma das vias inibidas pelo lítio e associada ao seu efeito terapêutico. Assim como também há evidências da interconexão entre genes que regulam a sinalização dopaminérgica (*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *GRM3* e *GRM4*), a resposta

ao estresse (*ND4*, *NDUFV2*, *XBPI* e *MTHFR*), a inflamação (*PDE4B*, *IL1B*, *IL6* e *TNF*), a apoptose (*BCL2A1* e *EMPI*) e a mielinização mediada por oligodendrócito (*eIF2B*) (Carter CJ, 2007a, Carter CJ, 2007b, Padmos RC et al., 2008)

2.6.2. Fatores Neuroanatômicos

A realização de exames de neuroimagens, que permitem o estudo da estrutura e função cerebrais, tem sido limitada no TB devido ao fato de seus procedimentos exigirem que o indivíduo permaneça imóvel, o que não pode ser garantido nos indivíduos durante a mania. Por outro lado, o uso de medicamentos impacta a função cerebral, e prejudica uma análise da neuropatologia sem o efeito da medicação. Embora nos casos de sintomatologia mais leve possa haver suspensão da terapia, em indivíduos com história de sintomatologia severa é clínica e eticamente inviável (Phillips ML et al., 2008, Grande I et al., 2012).

A maior parte das evidências sobre estrutura e função cerebrais no TB carecem de confiabilidade e robustez. Entretanto, há resultados consistentes que demonstraram que a neuropatologia do TB não está associada com mudanças em uma região específica do sistema nervoso central (SNC), mas com a disfunção de redes cerebrais interconectadas, envolvidas com atividades emocionais, cognitivas, comportamentais, autonômicas, neuroimunoendocrinológicas e do ciclo circadiano (Goldstein BI et al., 2009, Strakowski SM et al., 2012).

Neste sentido, duas redes de interconexão envolvendo regiões do córtex pré-frontal e do sistema límbico participam da fisiopatologia do TB. A primeira está associada ao aspecto emocional e inclui o córtex pré-frontal ventromedial, o giro do cíngulo anterior, o núcleo accumbens, o globo pálido e o tálamo. A conexão estabelecida entre essas áreas controla as respostas da amígdala principalmente relacionadas ao sentimento de melancolia desencadeado pela memória de perdas passadas. A segunda envolve o aspecto cognitivo do TB e inclui o córtex pré-frontal ventrolateral, o giro do cíngulo dorsomedial, o estriado ventromedial, o globo pálido e o tálamo. Outras conexões do SNC comprometidas no TB estão associadas com processamento e planejamento de informações, criatividade e memória autobiográfica e envolvem áreas do córtex pré-frontal, do sistema límbico, parietais, mesotemporais e do pré-cuneus. (Maletic V and Raison C, 2014)

Em relação ao tamanho do hipocampo os resultados são controversos e pouco conclusivos. Há casos de aumento, outros de diminuição e outros em que não houve

mudanças significativas no volume hipocampal. Em relação à amígdala, suas mudanças parecem estar associadas com a progressão da doença, reforçando a ideia de que mudanças anatômicas e possivelmente funcionais ocorrem de acordo com a idade. Assim, em crianças e jovens há redução do tamanho da amígdala e na fase adulta um aumento (Blond BN et al., 2012, Beyer JL and Krishnan KR, 2002).

2.6.3. Neurotransmissão

O TB está associado a um desequilíbrio nos circuitos de transmissão neuronal, com exacerbção da transmissão dopaminérgica e glutamatérgica, assim como redução da transmissão colinérgica e distúrbio da serotoninérgica (Rapoport S I, 2014).

Estudos em neuroimagem e farmacológicos têm demonstrado que no TB a mania ocorre com incremento de dopamina e disfunção do receptor de dopamina. O aumento de dopamina poderia ser o responsável por induzir a depressão (Maletic V and Raison C, 2014). Em relação à serotonina, alguns estudos indicam que na depressão está diminuída a ligação de serotonina a seus receptores e aumentada na mania, porém esses resultados não foram consistentes ou reproduzíveis. Por outro lado, tem-se achado que no TB há uma alteração de norepinefrina, embora os resultados sejam ainda controversos e inconclusivos (Maletic V and Raison C, 2014).

Em relação ao ácido γ -aminobutírico (GABA) e ao glutamato, no TB parece ocorrer uma alteração da recaptação destes neurotransmissores, como foi demonstrado em estudos em plaquetas de pacientes bipolares, nos quais foi relatado um aumento da recaptação de GABA na depressão e diminuição na mania. Em relação ao sistema glutamatérgico um aumento na recaptação de glutamato foi descrito na fase de mania (Daniele S et al., 2012).

Apesar de contribuírem com o entendimento das alterações de neurotransmissores no TB, os estudos sobre a neurotransmissão não explicam completamente a fisiopatologia do TB e são inconsistentes ou pouco reproduzíveis. É fundamental ressaltar a estreita comunicação bidirecional do SNC, com os sistemas endócrinos e imune, os quais também parecem desempenhar um importante papel na fisiopatologia do TB (Maletic V and Raison C, 2014).

2.6.4. O eixo Hipotálamo – Pituitária – Adrenal (HPA).

Distintas evidências demonstraram que situações de estresse podem desencadear os sintomas do TB (Kraepelin E, 1899, Post RM, 1992, Kessing LV, 1998, Kendler KS, 2001, Kessing LV, 2005, Post RM, 2007, Post RM, 2009, Muneer A, 2016). Este vínculo é descrito pela alteração no eixo HPA que os pacientes apresentam (Watson S, 2004). Assim, estudos sobre os níveis de cortisol sistêmico de indivíduos com TB têm consistentemente demonstrado elevação em comparação com controles. Além disso, resultado negativo no teste de supressão de liberação de hormônio corticotrópico com dexametasona tem indicado comprometimento do receptor de glicocorticoide no TB. Adicionalmente, a perda da função do receptor de glicocorticoide pode ser influenciado pelo aumento dos níveis de citocinas descrito no TB (Watson S, 2004, Muneer A, 2016).

Há evidências de que a desregulação do eixo HPA no TB é originada por uma liberação exagerada do hormônio liberador de corticotrofina, que causa aumento dos níveis circulantes de glucocorticoides. A subsequente desregulação cortico – límbica, aumenta a atividade na amígdala, e prejudica a função reguladora do hipocampo (Drevets WC, 2008, Maletic V and Raison C, 2014).

Apesar de os estudos sobre a regulação hormonal terem fornecido informações relevantes sobre a fisiopatologia do TB, alterações do sistema endócrino em geral e do eixo HPA não são exclusivas dessa condição e já foram descritas em diferentes transtornos mentais como a depressão maior (Wingenfeld K, 2015). Além disso, não é suficiente para explicar por completo os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TB.

2.6.5. Estresse oxidativo e metabólitos do triptofano

2.6.5.1 A mitocôndria no Transtorno Bipolar

A mitocôndria é a organela responsável pelos processos celulares de obtenção de energia química a partir de moléculas de alta energia através de reações de oxidação. As espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS) são subprodutos dessas reações que tem sido associados com dano de proteínas, DNA e lipídeos celulares (Andreazza AC et al., 2007). Esta organela regula importantes processos como neuroplasticidade, apoptose, controle dos níveis de cálcio celular e neurotransmissão. Alteração de proteínas mitocondriais

no TB foi descrita em estudos genéticos, indicando um potencial envolvimento de mitocôndrias no desenvolvimento desse transtorno (Muneer A, 2016, Andrezza AC et al., 2007).

Há evidências que demonstraram aumento de espécies reativas de oxigênio no TB. As ROS mediarão suas ações por ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) e induzirão excitotoxicidade, que corresponde ao processo de morte de neurônios por superatividade do sistema glutamatérgico e aumento do influxo de cálcio (Sorace S and Krause KH, 2009) (Maletic V and Raison C, 2014). Além disso, as ROS também induzem resistência ao cortisol, afetando o deslocamento intracelular do receptor de glicocorticoide, induzindo desregulação do eixo HPA. (Maletic V and Raison C, 2014)

Estudos demonstraram ainda que as ROS aumentam os níveis de citocinas inflamatórias, promovem dano da barreira hematoencefálica e afetam a estabilidade de neurotransmissores. (Maletic V and Raison C, 2014). Adicionalmente, os radicais livres gerados durante o processo de oxidação no TB induzem ativação das MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) (Muneer A, 2016). Outro evento associado a disfunção mitocondrial no TB é o aumento da peroxidação de lipídeos no SNC bem como dano de DNA e RNA, por ação de radicais livres (Anderson G, 2015)

2.6.5.2 Neuroregulação de metabólitos do triptofano

Estudos recentes vêm estabelecendo que no TB há aumento central e periférico de metabólitos de triptofano (TRYCAT), diminuindo assim a disponibilidade deste aminoácido para ser usado na síntese do neurotransmissor serotonina e do hormônio melatonina. Este processo ocorre principalmente como resultado da indução da enzima IDO (2,3-dioxigenasaindolamina) que cataboliza o triptofano em resposta ao aumento da concentração de citocinas inflamatórias (Anderson G, 2015). O processo de catabolismo do triptofano acontece no neurônio e é induzido por atividade de células da glia, principalmente micróglia. Os principais produtos do catabolismo de triptofano são o ácido quinurênico (KYNA) e o ácido quinolínico (QUIN) que têm ação contrárias. Os TRYCAT participam de distintos processos celulares, como a neurotransmissão e a excitotoxicidade. Por exemplo, QUIN é agonista do receptor NMDA, enquanto que KYNA é antagonista, assim um aumento na concentração de QUIN, desencadeia a morte neuronal (Anderson G, 2015).

2.6.5.3. Ciclo circadiano e do sono

Indivíduos com TB apresentam alterações do ciclo circadiano e do sono. Estudos do sono por polissonografia revelaram que em comparação com controles, indivíduos com TB apresentam maior variação nos padrões de sono, como maior fragmentação e menor eficácia (Milhiet V et al., 2011, Milhiet V et al., 2014). Essas alterações parecem estar associadas com o hormônio melatonina cuja produção nos humanos está envolvida na indução do sono. Neste sentido, no TB há alterações na concentração de melatonina plasmática, assim algumas evidências indicam que, esta é duas vezes menor do que em indivíduos saudáveis. Alterações na produção de melatonina podem estar relacionadas com as disfunções descritas nas vias de triptofano e serotonina. Há evidências de que o aumento de catabólitos do triptofano que acontece no TB, prejudica a síntese de melatonina (Gonzalez R, 2014).

2.7. FATORES NEUROTRÓFICOS E CITOLOGIA NEURONAL

O descrito até o presente é uma perspectiva isolada, que não integra satisfatoriamente os sistemas para explicar de forma completa a fisiopatologia do TB. Uma potencial explicação se deve ao fato de que estudos em humanos apresentam importantes limitações éticas dificultando a análise direta do SNC. As medições indiretas muitas vezes não são reproduzíveis ou não refletem as particularidades da doença associadas a idade ou gravidade de progressão dos sintomas. Dessa forma, atualmente, a identificação de um potencial biomarcador para o TB constitui um importante desafio.

Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos de comunicação e sinalização que regulam os processos envolvidos no TB, devem ser estudados com mais profundidade, visando identificar mecanismos singulares associados a doença. Na última década, houve progressos no estudo de bases moleculares que participam desses processos de comunicação biológica no TB.

O desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência neuronal dependem de uma família de proteínas denominada de fatores neurotróficos, os quais modulam processos como a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Barbosa I G, 2012). A família dos fatores neurotróficos é constituída pelas neurotrofinas, membros da família do GDNF (fator

neurotrófico das células de linhagem glial) e citocinas neuropoiéticas (como a neurotrofina1 – NNT1) (Poo M, 2001, Boyd J G, 2003).

Todas as neurotrofinas têm características bioquímicas similares. As mudanças nos seus domínios determinam a união a receptores específicos, que levam a diferentes efeitos biológicos. Correspondem à família destas proteínas: o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic fator* - BDNF) , o fator de crescimento neuronal (*nerve growth factor* - NGF) e as neurotrofinas 3, 4/5 e 6 (Hu Y, 2008, Teixeira A L, 2010).

No SNC o BDNF é a neurotrofina mais abundante, expresso principalmente em áreas cerebrais responsáveis pela regulação da emoção e da cognição como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (Barbosa I G, 2012). De forma interessante, como o hipocampo controla a atividade do eixo HPA, alterações nos níveis de BDNF, têm sido associadas a indução da fase de mania por estresse (Schüle C, 2006, Maletic V and Raison C, 2014).

Algumas funções em que o BDNF participa, incluem a regulação do crescimento de axônios e dendritos, liberação de neurotransmissores (serotonina, glutamato, GABA), plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal (Barbosa I G, 2012, Maletic V and Raison C, 2014).

Estudos sugerem que os níveis de BDNF, em indivíduos com diagnóstico de TB, estão reduzidos na fase de depressão (em soro e plasma) e de mania (em soro). As concentrações de BDNF podem ser afetadas pelo percurso da doença ou pelos tratamentos, podendo aumentar com a progressão do TB. Porém, os resultados sobre o papel dessa neurotrofina no TB são ainda controversos (Munkholm K and 2016).

O NGF está expresso principalmente no córtex, hipocampo, pituitária e medula espinal; desempenhando funções de manutenção do sistema nervoso simpático e colinérgico (Barbosa I G, 2012). Alterações do NGF têm sido associadas com o declínio cognitivo encontrado em diferentes condições neuropsiquiátricas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla (Barbosa I G, 2012). Entretanto, não tem sido amplamente investigado no TB, e os resultados existentes são inconsistentes (Rao S, 2017).

O membro principal da família dos fatores neurotróficos das células da linhagem glial é o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). Há evidências de que o GDNF seja o principal fator neurotrófico envolvido na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, estando associado, dentre outras funções, à liberação de neurotransmissores. Portanto, seria plausível a hipótese de que este fator neurotrófico poderia participar de processos neurobiológicos associados ao TB. De forma interessante, há evidências da participação do GDNF em

transtornos graves do humor, como por exemplo o TB e o transtorno de depressão maior; que apresentam alterações dos processos de crescimento, maturação e morte de células da glia e neuronais (Tsybko A S, 2017). Outro processo nos qual o GDNF está envolvido é no controle dos circuitos de noradrenalina e de GABA (Barbosa I G, 2012).

Estudos *post mortem* demonstraram que no TB pode ocorrer alteração dos três tipos de células da glia: astrócitos, oligodendrócitos e microglia, incluindo diminuição de número e densidade celular. Estudo prévio demonstrou que o uso de lítio ou valproato, medicamentos utilizados no tratamento do TB, revertem a ativação de células da glia (Maletic V and Raison C, 2014).

2.8. INFLAMAÇÃO NO TRANSTORNO BIPOLAR

O papel do sistema imune em transtornos mentais começou a ser conhecido provavelmente a partir de 1927, com o trabalho do prêmio nobel Julius Wagner-Jauregg, sobre o tratamento de psicose por inoculação de malária. Posteriormente, Ader e Cohen (1975) demonstraram que a resposta do sistema imune é influenciada por alteração do comportamento, induzindo imunossupressão em ratos submetidos ao teste de condicionamento aversivo à gustação (conditioned taste aversion experiment). Assim, em 1992 foi adotado o termo de *sickness behaviour* ou comportamento do doente, para descrever um conjunto de sintomas incluindo febre, perda de apetite, anorexia, apatia e depressão em resposta a uma infecção sistêmica. O LPS (lipopolissacarídeo), presente na membrana de bactérias gram-negativas, é um importante indutor da resposta imune e tem sido utilizado para o estudo do *sickness behavior* e do comportamento do tipo depressivo em roedores (Myint A M and Kim Y K, 2014).

A comunicação bidirecional dos processos imunológicos com o SNC, pode ser explicada em parte pela interação desses sistemas promovida pelas chamadas citocinas, as quais são produzidas por e apresentam receptores tanto em células do sistema imune, quanto do SNC.

O termo “citocina” inclui interleucinas (ILs) e interferons (IFNs). As citocinas são uma classe de moléculas de sinalização que participam, dentre outras inúmeras funções, da comunicação celular. Inicialmente, foram caracterizadas como componentes da resposta imune, entretanto sabe-se que têm um papel em diversos processos fisiológicos, como a neurogênese e a maturação neuronal no SNC (Basrai HS et al., 2016) . As citocinas são

produzidas por numerosas células, como macrófagos, células dendríticas os precursores de neurônios (Ransome MI et al., 2004). Podem ser classificadas como proteínas, peptídeos ou glicoproteínas e apresentam função autócrina, parácrina e justácrina. (Mousa A, 2013). As citocinas, em geral modulam a função, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. No SNC é capaz de regular a liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos que influenciam a resposta inflamatória e vão mediar portanto, a comunicação entre o SNC e o sistema imune (Mousa A, 2013).

O papel das citocinas em diferentes transtornos mentais tem sido amplamente estudado, embora ainda não seja claro se a resposta imune inicia no SNC ou na periferia. Porém, as citocinas parecem contribuir para o desenvolvimento de doenças mentais, por meio de alguns mecanismos, que incluem o controle da neurotransmissão, da atividade do eixo HPA, regulação da plasticidade neuronal e da produção de fatores neurotróficos (MILLER et al., 2009).

As citocinas inflamatórias, como IL2, IL6 e IFN γ podem promover a excitotoxicidade por meio da ativação de IDO (citocinas anti-inflamatórias, como IL4, IL10 a inibem) e dos catabólitos do triptofano. Estas citocinas ativam a micróglia, e induzem a produção de citocinas por essas células, iniciando um *loop* de retroalimentação positivo com a astrogliia, que por sua vez começa a liberar citocinas e adenosina trifosfato (ATP) que induzem a micróglia a produzir mais citocinas, perpetuando o ciclo de inflamação que leva por fim a excitotoxicidade e a morte neuronal. Neste contexto, a astrogliia para de produzir GABA, e a micróglia se desestabiliza, adquirindo uma forma ameboide capaz de se deslocar através do cérebro. Nesse ambiente de inflamação, a astrogliia também deixa de captar o glutamato em excesso da fenda sináptica e começa a liberá-lo, induzindo excitotoxicidade. Paralelamente a astrogliia não expressa mais BDNF e GDNF, afetando a função da oligodendroglia de mielinização do neurônio, o que também induz apoptose neuronal (Maletic V and Raison C, 2014).

Estudos têm demonstrado que no TB, seja durante os episódios de mania ou de depressão, há exacerbação da resposta inflamatória (Munkholm et al., 2013; Teixeira et al., 2013) (Barbosa et al., 2014; Munkholm et al., 2013). Por exemplo, aumento significativo nos níveis das citocinas interleucinas (IL) -4 e IL-6, Fator de Necrose Tumoral (TNF), do seu receptor solúvel do tipo 1 (sTNFR-1), do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), bem como das quimiocinas CXCL10 e CXCL11, foi encontrado no soro e plasma de pacientes em mania (Barbosa et al., 2014; Munkholm et al., 2013). Em pacientes em depressão bipolar foi

achado no sangue, aumento de IFN γ e IL1 β comparados com indivíduos saudáveis (Remlinger-Molenda A et al., 2012)

2.9. RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO TRANSTORNO BIPOLAR

Os processos de produção e sinalização de citocinas são regulados para dar uma resposta biológica coordenada. A regulação da sinalização de citocinas ocorre nos diferentes níveis associados com o início, duração e magnitude. Um dos mecanismos mais importantes de regulação de citocinas é através da família SOCS (Alexander WS and Hilton DJ, 2004). Assim, as alterações dos níveis de citocinas durante o TB poderia estar associada com a perda da regulação destes mediadores, como acontece durante doenças infecciosas antes estudadas, como por exemplo na infecção por *Plasmodium berghei ANKA* (PbA) (Brant F, 2016). Na ausência de SOCS2, os camundongos infectados com PbA apresentaram alteração dos níveis de citocinas e comportamento tipo ansiedade (Brant F, 2016).

Por outro lado a resolução da inflamação por SOCS2 foi descrita previamente por nós em outros contextos como na atividade anti-inflamatória de lipoxinas (LXA) induzidas por aspirina ou *T. gondii* (Machado FS, 2006). A enzima chave na produção de lipoxinas é 5-LO, que também produz leucotrienos com atividade inflamatória. Zileuton é um inibidor seletivo de 5-LO indicado em doenças causadas por exacerbação de leucotrienos como asma (Israel E et al., 1990).

2.9.1. Supressor da Sinalização de Citocinas (SOCS) 2

SOCS é uma família de oito membros (SOCS1-SOCS7 e CIS), que têm em comum um domínio C-terminal conservado SOCS-BOX e um domínio variável N-terminal (Yoshimura et al., 2007). SOCS2 participa da regulação de vias de sinalização, modulando citocinas, fatores de crescimento, hormônios entre outros (Rico-Bautista et al., 2006; Pamplona et al., 2009) e é expressa constitutivamente em diferentes tecidos e células como linfócitos T, macrófagos, leucócitos, células dendríticas, neurônios, medula óssea e hepatócitos, (Rico-Bautista et al., 2006).

SOCS2 é induzida em resposta à ativação de vias de sinalização como a JAK-STAT (*janus kinase - signal transducer and activator of transcription Signal*). Os mecanismos de regulação de SOCS2 nesta via incluem o bloqueio da ligação de STAT a JAK, impedindo que o sinal dependente da dimerização de STAT por ligação a JAK propague-se, assim como interagindo com elementos de E3 ubiquitina ligase para poliubiquitar JAK, e promover a degradação de JAK por proteosoma (Alexander WS and Hilton DJ, 2004).

No SNC, SOCS2 participa da neurogênese durante o desenvolvimento embrionário (Polizzotto et al., 2000). O processo de diferenciação celular em neurônio ou astrócito é também controlado por SOCS, mediante a inibição do hormônio de crescimento (GH) que regula a expressão de neurogenina-1 (Ngn-1) e por conseguinte o processo de diferenciação celular (Turnley et al., 2002). Assim, camundongos geneticamente modificados com deficiência na expressão de SOCS2 apresentam diminuição na densidade neuronal e um aumento na maturação de astrócitos (Turnley et al., 2002) (Ransome e Turnley, 2005). Além disso, SOCS2 tem um papel regulador na via de sinalização de fatores neurotróficos. Há evidências de que SOCS2 influencia a sinalização mediada por NGF por meio da regulação do receptor de tirosina quinase A (TrkA) (Uren et al., 2014; Uren e Turnley, 2014).

Conforme mencionado anteriormente, a atividade de alguns eicosanoides como a anti-inflamatória das LXAs também depende de SOCS2. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram o efeito anti-inflamatório da LXA4 e de LXA induzidas pelo ácido acetilsalicílico (anti-inflamatório não esteroide), sendo este efeito dependente de SOCS2. Entre os receptores de LXA, o receptor arilhidrocarbono (AhR) citoplasmático/nuclear, mas não o de superfície celular (ALXR), é crítico para a indução de SOCS2 (Machado FS et al., 2006).

Nesse contexto, o SOCS2 parece desempenhar um papel fundamental na regulação, de uma forma integrada dos diversos processos envolvidos na comunicação entre os sistemas imune, SNC e endócrino, associados a fisiopatologia do TB. Dessa forma, estudar o papel de SOCS2 no TB pode constituir uma estratégia relevante para melhor compreender a fisiopatologia do TB bem como para identificação de potenciais alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos.

2.9.2. Lipoxinas e 5-lipoxigenase

Os eicosanoides são lipídeos de sinalização derivados do ácido araquidônico (AA) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), que controlam diferentes processos homeostáticos e inflamatórios (Dennis EA and Norris PC, 2015). Os metabólitos dos eicosanoides por resultantes da atividade das enzimas ciclooxigenase (COX) e 5-LO, prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente, (Imagem 1) são conhecidos na inflamação, por participarem dos processos relacionados a dor, edema e febre e em condições asmáticas, respectivamente (Dennis EA and Norris PC, 2015). O papel fisiológico de apenas alguns eicosanoides é conhecido, sugere-se que a ativação do inflamassoma e o aumento de citocinas induzam a via dos eicosanoides.

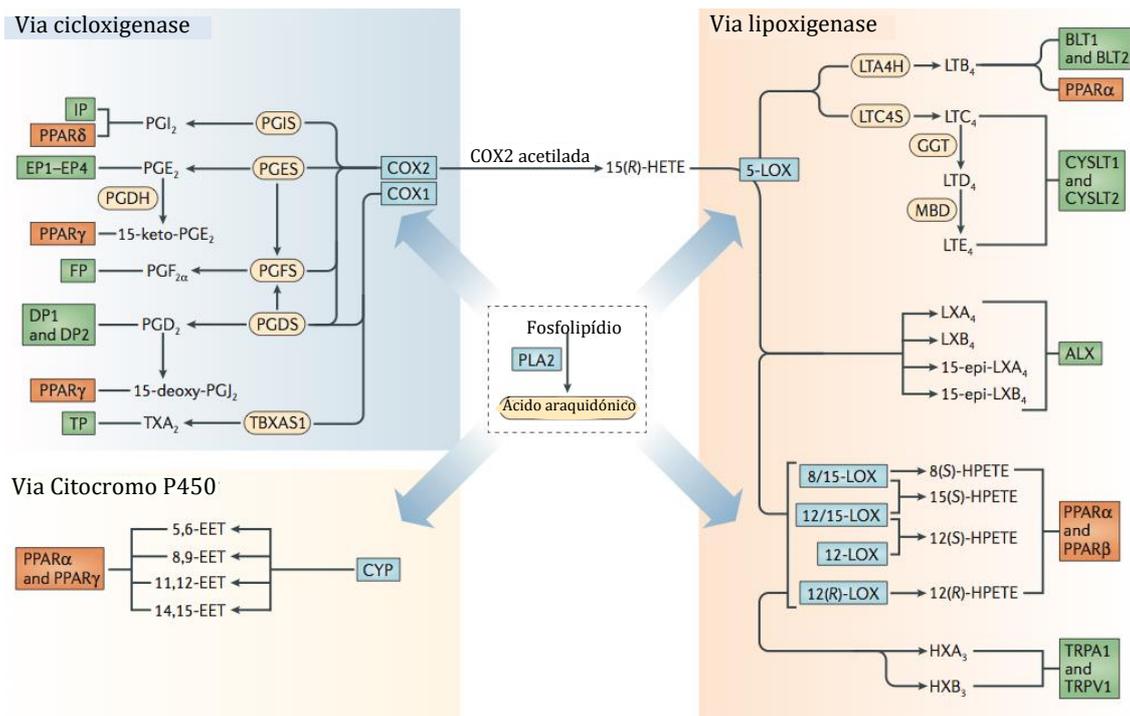


Imagem 1. **Biosíntese e sinalização de receptores de eicosanoides.** Uma visão lipidômica das vias de fosfolipase A2 (PLA2), ciclooxigenase 1 (COX1), COX2, 5-lipoxigenase (5-LOX), 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX e citocromo P450 (CYP) epoxihidrolase da biossíntese a partir do ácido araquidônico. As enzimas do metabolismo são mostradas em ovais amarelos; as de eicosanoides e seus receptores são mostradas como quadros verdes. Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) que são potencialmente ativados por eicosanoides são também mostrados (quadros laranjas). A via de CYP ω -hidroxilase e as espécies lipídicas derivadas de outros ácidos graxos não são mostradas. CYSLT1, receptor de cisteinil leucotrieno 1; DP, receptor de PGD₂; EET, ácido epoxieicosatrienoico; EP, receptor de PGE; FP, receptor de PGF; GGT, γ -glutamyltransferase; HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroxiperoxieicosatetraenoico; HX,

hepoxilina; IP, receptor PGI; LT, leucotrieno; LTA4H, hidrolase LTA4; LTC4S, sintase de LTC4; LX, lipoxina; MBD, dipeptidase ligada a membrana; PG, prostaglandina; PGDH, PG desidrogenase; PGDS, PGD sintase; TBXAS1, TXA sintase; TP, receptor de tromboxano; TRPA1, receptor potencial transitório anquirina 1; TRPV1, receptor potencial transitório vaniloide 1; TX, tromboxano. Adaptado de (Dennis EA and Norris PC, 2015)

As células sintetizam de forma específica um tipo seletivo de eicosanoides, embora as quantidades que produzam vão depender das condições fisiológicas do tecido em que residem. Por outro lado, a expressão dos receptores de eicosanoides também é específica da célula e do tecido. Assim funções fisiológicas destes lipídeos nos diferentes tecidos são distintas. Por exemplo, a ação da prostaglandina E₂ (PGE₂) em neurônios está associada a percepção de dor, e o seu sinal autócrino em macrófagos, à diminuição da produção de TNF (Dennis EA and Norris PC, 2015).

As lipoxinas (LX) são mediadores eicosanoides anti-inflamatórios, produzidos por 5-LO. A família das lipoxinas é composta por trihidroxieicosanoides que incluem a lipoxina A₄ (LXA₄) e lipoxina B₄ LXB₄; assim como seus epímeros induzidos por aspirina 15-epi-LXA₄ e 15-epi-LXB₄. Estes lipídeos exercem suas atividades por união a seus receptores LXAR ou AhR, dentre as quais podemos citar a inibição do recrutamento de neutrófilos, da migração de leucócitos, da translocação de NFκB, da adesão de moléculas, da função de células natural killer, da produção de quimiocinas induzidas por TNF e da expressão dos receptores de quimiocinas (Bandeira-Melo C et al., 2000 , Clish CB et al., 1999 , Hachicha M et al., 1999 , Ramstedt U et al., 1985).

A síntese de eicosanoides em condições fisiológicas contribui para a homeostase. Entretanto, em condições como a asma, ocorre a exacerbação da produção de leucotrienos derivados da atividade da 5-LO. Nesse sentido, uma estratégia vantajosa para conter os efeitos pleiotrópicos dos eicosanoides consiste em inibir sua formação ou as ações mediadas por seus receptores. Assim, o uso de inibidores seletivos como o Zileuton permite o estudo do papel dos eicosanoides seja em condições fisiológicas ou em contextos patológicos, como foi observado no modelo animal de isquemia cerebral (Silva BC et al., 2015).

Baseado no caráter inflamatório do TB e na possibilidade de prejuízos na resolução da inflamação estarem associados a fisiopatologia desse transtorno, manipular farmacologicamente o metabolismo de eicosanoides, agindo sobre a atividade das enzimas e dos receptores da via, pode representar uma estratégia terapêutica promissora para o TB.

2.10. MODELOS ANIMAIS

Na atualidade não existe um modelo animal de TB que seja ideal, isto é, que mimetize o aspecto oscilatório entre os episódios de depressão e mania característicos da doença (Kato T, 2016). A complexidade do TB, a ausência de biomarcadores válidos e o conhecimento apenas parcial dos mecanismos de ação dos estabilizadores do humor limitam o desenvolvimento de um modelo animal desta doença. Os principais limitantes desta abordagem é que refletem só um dos polos do TB, assim a abordagem experimental de estudo do TB consiste na estratégia de estudar por separado os comportamentos do tipo depressivo e maníaco (Valvassori SS, 2013) (Gould TD and Einat H, 2007).

Os modelos atuais de depressão são baseados em alterações do comportamento induzidas por estresse, como por exemplo o de separação maternal, estresse mediano crônico imprevisível, entre outros. Todos eles refletem sintomas de outras condições que se sobrepõem com os da depressão bipolar, como a depressão maior. Na atualidade não existe um modelo validado para a depressão bipolar (Kato T, 2016).

A mania é a característica principal no TB (American-Psychiatric-Association, 2013). Os atuais modelos animais de mania são os ambientais, genéticos ou farmacológicos. Estes satisfazem de forma limitada a validade de construção (mecanismo da fisiopatologia), de sintomatologia e de predição (resposta à farmacoterapia) para reproduzir o observado na clínica. Os modelos ambientais, como o de derivação do sono, e os genéticos, como o camundongo deficiente para o transportador de dopamina, são menos validados e usados (Ralph-Williams RJ et al., 2003, McClung CA, 2011, Young JW et al., 2011)

Entre tanto os modelos farmacológicos têm sido mais usados no estudo da fisiopatologia do TB (Einat H, 2006, Young JW et al., 2011). Os fármacos psicoestimulantes como as anfetaminas, são mais usados na atualidade como modelo de mania do que outros como Quinpirole, Ouabaína e Ketamina (El-Mallakh RS et al., 1995, Kofman O et al., 1998, Shaldubina A et al., 2002, Young J, 2010, Ghedim FV et al., 2012). Considerando a participação da dopamina na fisiopatologia da mania, as anfetaminas alteram a neurotransmissão deste neurotransmissor e induzem hiperlocomoção, reproduzindo a principal característica dos sintomas da mania em camundongo (Fiorino DF and Phillips AG, 1999). O modelo de anfetaminas reflete além da hiperlocomoção, as alterações de estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e dano do DNA, as quais são reversadas pelo tratamento com lítio (O'Donnell KC and Gould TD, 2007). As características da fisiopatologia que este modelo tem, também são utilizadas como modelo para outras condições

psiquiátricas, como a esquizofrenia; o que limita o uso deste modelo na mania (Young JW et al., 2011).

Outro modelo farmacológico é a administração do inibidor da recaptação de dopamina GBR 12909 que induz hiperlocomoção e aumento do comportamento exploratório em animal (Young J, 2010). O desenvolvimento deste modelo foi pelo método de aproximação inversa (*reverse-translational approach*), baseada em que indivíduos com TB, avaliados na técnica de padrões de comportamento (Behavioral Pattern Monitor - BPM), apresentaram padrões motores e exploratórios diferente do que os indivíduos com esquizofrenia (Perry W, 2009). O fenótipo observado no humano é reproduzido em camundongo com uma única dose de GBR 12909. Foi demonstrado por outras pesquisas que a indução de comportamento tipo mania por GBR 12909 ocorre com alterações de estresse oxidativo (Queiroz AI, 2015). Este modelo foi usado por nós durante a presente pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o papel de SOCS2 na depressão e no comportamento tipo mania experimental e o efeito do tratamento de Zileuton na sua regulação

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o comportamento do tipo depressivo em camundongos deficientes de SOCS2 (SOCS2^{-/-}).
- Avaliar a expressão de SOCS2 em diferentes regiões do sistema nervoso central (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) de camundongos da linhagem C57BL6, após a indução farmacológica do episódio agudo de mania por GBR 12909.
- Investigar a ocorrência do episódio agudo de mania induzido por GBR 12909 em camundongos (SOCS2^{-/-}).
- Estudar a expressão de citocinas e fatores neurotróficos no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos C57BL6 e SOCS2^{-/-}, após indução farmacológica do episódio agudo de mania por GBR 12909.
- Estudar o efeito da inibição da enzima 5-LO por meio da administração de Zileuton no episódio agudo de mania induzido por GBR 12909 em camundongos C57BL6 e SOCS2^{-/-}.
- Quantificar a expressão de citocinas e fatores neurotróficos no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos C57BL6 e SOCS2^{-/-} tratados com Zileuton, após indução farmacológica do episódio agudo de mania por GBR 12909.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

A realização dos experimentos contou com a utilização de camundongos machos C57BL6 e SOCS2^{-/-} com idade entre 8 a 12 semanas. Os camundongos C57BL6 foram criados e obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e os animais SOCS2^{-/-} foram criados e obtidos no biotério de criação próprio localizado no bloco C2 do (ICB-UFMG). Os camundongos foram criados e utilizados segundo a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (CONCEA, 2016). Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UFMG, sob os números de protocolo 78/2014 e 174 / 2016.

4.2. FÁRMACOS E TRATAMENTOS

4.2.1. GBR 12909

Também chamado Vanoxerina, é um inibidor seletivo do transportador de dopamina. O GBR 12909 (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA) solubilizou-se em salina seguida por sonicação por 2–4 h a 40 °C (Young J et al., 2010). Administração: 15mg/Kg intraperitoneal, em volume de injeção de 10mL/Kg (Young J et al., 2010).

4.2.2 Zileuton

Comprimidos com 600mg de Zileuton (Cyflo ®- Chiesi) (ZyFlo® Critical Therapeutics, Inc., Lexington, Massachusetts) que foram triturados em pistilo de vidro e então suspensos em solução de carboximetilcelulose sal sódico (Synth®-Labsynth, Diadema, Brasil) em PBS a 0,5% foram utilizados para o tratamento. Os animais foram tratados por via oral (gavagem) na dose de 75 mg/Kg, estabelecida por literatura (Shi S et al., 2013) durante três dias antes, no dia, e 24 horas depois, da administração de GBR 12909.

4.3. MODELO ANIMAL PARA TRANSTORNO BIPOLAR

Na atualidade não existe modelo animal que reproduza as complexas condições e sintomas que caracterizam o TB na sua totalidade (Valvassori SS, 2013). Por isto, utilizaram-se os modelos de depressão e de mania separadamente.

4.3.1. Testes de depressão: Nado forçado

Foi desenvolvido em rato e adaptado para camundongo em 1977 por Porsolt e colaboradores (Porsolt RD, 1977), para avaliar o comportamento de depressão simulada em roedores, assim como para testar novos fármacos antidepressivos. Os animais foram deslocados para a sala contígua à sala de experimentação, uma hora antes do teste. As duas salas e o corredor que as une mantiveram-se sob condições iguais, temperatura ambiente, exaustação de ar e luz amarela comum. Como descrito na literatura (Can A, 2012), um recipiente de vidro transparente, de 17 cm de diâmetro, 27 cm de altura e 5 L de capacidade, preencheu-se com água a temperatura entre 23 e 25 °C, até 15 cm de altura, para evitar que os camundongos tocassem o fundo do recipiente. Cada animal transportou-se em uma caixa de plástico, colocou-se a nadar livremente e se registrou em uma câmera de vídeo (SONY DCR-SR68, 680K pixels, 1/8-inch CCD) durante seis minutos. Depois foi retirado da água, secado com uma toalha e colocado na gaiola na sala contígua. O tempo de imobilidade corresponde aos momentos registrados em que o animal não nadou. Para estimar o tempo de imobilidade consideraram-se apenas os últimos quatro minutos dos seis registrados; os dois primeiros minutos, de ambientação foram desconsiderados na estimativa do tempo de imobilidade.



Imagen2. Representação ilustrativa nado forçado

4.3.2. Modelo animal de Mania

A mania bipolar ocorre com perda da homeostase dopaminérgica, com o aumento da atividade dos sistemas dopaminérgicos no cérebro e alteração do transportador de dopamina (DAT). Segundo testes de padrões de comportamento em humanos (human behavioural pattern monitor – hBPM), pacientes em mania bipolar apresentam aumento da atividade, em quantidade, distância percorrida e aceleração, assim como incremento do comportamento exploratório específico (Perry W, 2009). A inibição seletiva do DAT por GBR12909 (Vanoxerina), aumenta a atividade motora e a exploração no teste de campo aberto em camundongo (Young J, 2010), validando assim, esta estratégia farmacológica como um excelente modelo animal de mania bipolar. Em camundongo macho entre 8 e 12 semanas de idade foi administrada uma única dose de GBR 12909 para induzir o comportamento de mania e logo depois da administração foi avaliado dito comportamento no campo aberto.

4.3.2.1 Campo Aberto

O teste de campo aberto permite avaliar simultaneamente atividade motora, exploração e padrões de locomoção de roedores (Young J, 2010). Para estimar a atividade motora utilizou-se uma unidade de detecção de movimento por infravermelho (Panlab Infrared Actimeter, 450 mm x 450 mm), que rastreou o deslocamento livre do animal mediante um sistema de 16 x 16 feixes infravermelho, dispostos no arcabouço da unidade. Mediante um software (ACTITRACK v2.7.13, Panlab, MA, USA) integrado à arena, o deslocamento foi registrado como distância percorrida. Quanto maior é a distância percorrida, indica uma atividade motora maior, denominada hiperlocomoção.

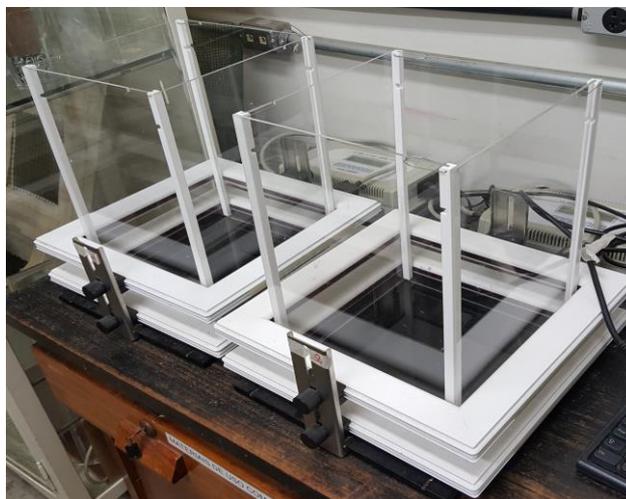


Imagem 3. Representação ilustrativa do campo

Os animais foram habituados na sala do campo aberto no mínimo uma hora antes do início do teste. A sala estava iluminada com luz de lâmpada branca e a temperatura era de 23 ± 3 °C. Cada animal foi colocado no centro da arena (unidade de detecção) imediatamente depois da administração intraperitoneal de GBR 12909 (15mg/Kg) ou salina 0.9% (controle), em volume de injeção de 10mL/Kg como descrito na literatura (Young J, 2010). A atividade de cada animal foi registrada durante 30 minutos. Duas arenas foram usadas ao mesmo tempo. A superfície e paredes da arena foram limpas com álcool 70% e secadas com papel toalha antes de cada animal ter sido testado. Os mesmos procedimentos foram realizados com os camundongos que receberam tratamento com Zileuton.

4.4. WESTERN BLOT

4.4.1. Preparo de homogenato de cérebro de camundongo

Camundongos machos com idade de oito a doze semanas foram sacrificados após 30 minutos e 24 horas, da administração de GBR 12909; usando anestésico em uma sobredose da mistura de 150mg/Kg de quetamina e 24-45mg/Kg de xilazina administrada via intraperitoneal. O cortex pré-frontal, hipocampo e estriado foram dissecados e congelados a -80 °C até o processamento. A extração foi feita com tampão RIPA [75µL/1 hipotálamo; 150µL/1 córtex pré-frontal ou 2 estriados; 200µL/ 2 hipocampos]; mediante disrupção com beads no homogenizador (Tissuelyser®- Quiagem) a 50 Hz, 1 min, 12 amostras à vez. Centrifugou-se (Neofuge 15R®- Heal force) a 10.000rpm, 9727 x g, 15 min., 4 °C e o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C até a análise. A quantidade de proteína foi dosada pelo método de Bradford (reagentes da Bio- Rad Protein Assay).

4.2.2. Electroforese

Em gel de poliacrilamida- Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate – SDS) (12.5%), se utilizou algum dos seguintes sistemas:

A. SE640 Basic, Serial Number: 3005220 – Hoefer; em gel de poliacrilamide 12.5% de 15 poços no esquema de voltagem a) 80V por 4h 40min., b) 100V por 35min. e c) 90V por

15min, e foi utilizado o padrão de peso molecular; Bio-Rad, *Precision plus protein all blues standards*.

B. Mini-PROTEAN® Tetra System – Biorad; em gel de poliacrilamida 12.5% no esquema de voltagem a) 60V por 1h., b) 100V por 2h e foi utilizado o padrão de peso molecular; Bio-Rad, *Precision plus protein all blues standards*.

4.4.3 Transferência úmida e ligação anticorpos.

Do gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas, para membranas de nitrocelulose (Millipore), em transferência úmida, overnight (16h) a 30V, 120mA, na câmara fria. Os sistemas usados, segundo o tamanho da membrana na electroforese A. BioRad Trans-Blot Cell Serial: 49BR31207, ou B. BioRad Trans-Blot Cell .

Posteriormente, lavou-se a membrana com TBS/Tween e bloqueio-se por 2h; com solução tampão de Tris (Tris-Buffered Solution - TBS), acrescida de 0,05% de Tween-20 (TBST), contendo 10% de leite desnatado, retirou-se do bloqueio e lavou-se com TBS/Tween.

4.4.3.1 Anticorpos

Primários: incubados overnight na câmara fria.

A. SOCS2 (coelho, Cell Signaling, 1:1000 em leite desnatado 1% em TBS/Tween 4mL)

B. β -actina (rato, Santa Cruz 1:3000 em leite sem gordura 1% em TBS/Tween 4mL)

Os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (HRP – horseradish peroxidase) foram colocados após incubação com o anticorpo primário, e lavagem com TBS/Tween, na concentração de 1:3000, colocados por 2h, temperatura ambiente.

4.4.4. Revelado

Por quimioluminiscencia - enhanced chemiluminescence- (ECL), em algum dos equipamentos:

A. ImageQuant LAS 4000® - GE Healthcare Life Sciences

B. Amersham Imager 600® - GE Healthcare Life Sciences

As quantidades de proteína foram determinadas por análise densitométrica, (através do programa ImageJ e segundo seu manual de instrução de análise densitométrica, 1.45s – National Institutes of Health, USA) e os valores normalizados com os valores da β -actina das mesmas amostras. Alterações nos valores das proteínas foram expressos como [valor da proteína/ β -actina]

4.5. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE NEUROTROFINAS E CITOCINAS POR ELISA E CBA

4.5.1. Preparo de homogenato de cérebro de camundongo

Camundongos machos com idade de oito a doze semanas foram sacrificados após 30 minutos e 24 horas da administração de GBR 12909 (tratados ou não com Zileuton), usando anestésico em uma sobredose da mistura de 150mg/Kg de quetamina e 24-45mg/Kg de xilazina administrada via intraperitoneal. O cortex pré-frontal, hipocampo e estriado foram dissecados e congelados a -80 °C até o processamento. A extração foi feita com tampão de extração de citocinas (1mL para 100mg de tecido) usando um homogenizador (Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Centrifugou-se (Neofuge 15R®- Heal force) a 10.000rpm, 9727 x g, 15 min, 4 °C; e o sobrenadante foi coletado em aliquota e congelado a -80 °C até a análise e detecção da concentração dos mediadores inflamatórios por meio das técnicas de CBA (Cytometric Bead Array) e ELISA (Ensaio imunoenzimático: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

4.5.2. Tampão de extração de citocinas

Foi preparada em tampão de fosfatos (PBS) 1X de composição: cada 1000 mL: NaCl 80g; KCl 2g; Na₂HPO₄ anidro 11.5g; KH₂PO₄ 2g; água milliQ q.s.p.

Cada 100 mL: NaCl 2.34g; tween 20 50 μ L; albumina de soro bovino (BSA) 500mg; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 1.7mg; cloreto de benzetônio 4,48mg; EDTA 37.2mg; 20 UI de aprotinina; PBS q.s.p

4.5.3. Determinação da concentração de citocinas por CBA

A concentração das citocinas TNF, IFN γ , MCP-1, IL6, IL10 e IL12 no tecido cerebral foi analisada por meio do método CBA (Cytometric Bead Array). O kit de CBA (Mouse Inflammation) obtidos da BD Biosciences foi utilizado de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. A concentração dos mediadores inflamatórios foi determinada por citometria de fluxo utilizando o FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

4.5.4. Determinação da concentração de fatores neurotróficos por ELISA

A concentração dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF no tecido cerebral foi analisada pelo método de ELISA. Os kits de ELISA obtidos da R&D Systems (DuoSet) foi utilizado de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. A concentração dos fatores neurotróficos foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Spectramax 190) no comprimento de onda de 450 nm.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o programa estatístico Prism (GraphPad, Software Mackiev) 5 para Mac OS X; versão: 5.0^a. As variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio dos testes estatísticos two tail t-student ou Two-way ANOVA. O pós-teste de Bonferroni foi utilizado para múltiplas comparações. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Camundongos deficientes para SOCS2 apresentam comportamento basal depressivo.

O teste do nado forçado foi realizado para análise do comportamento do tipo depressivo em camundongos SOCS2^{-/-}. Não houve diferença significativa na frequência e no tempo de nado entre os camundongos SOCS2^{-/-} e C57BL6, indicando que não houve alteração da atividade locomotora.

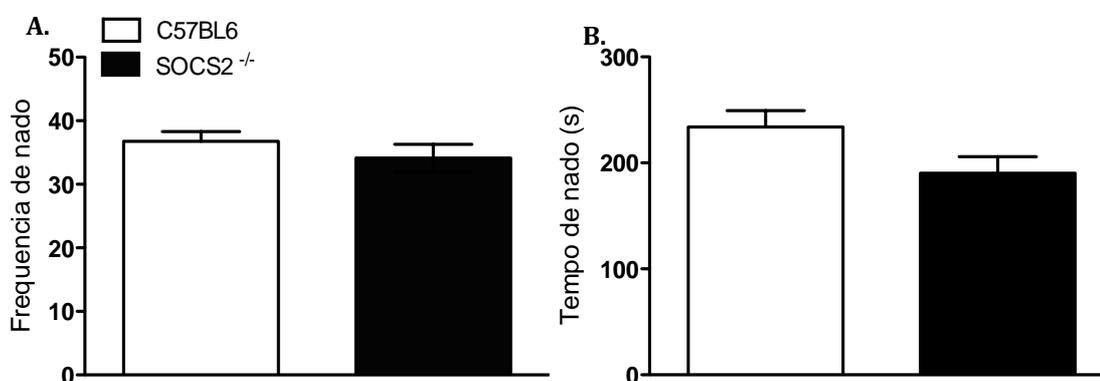


Figura 1. Camundongos SOCS2^{-/-} não apresentam alteração motora no teste do nado forçado. Camundongos deficientes para SOCS2 (SOCS2^{-/-}) e selvagens C57BL6 n= 8 por grupo, machos com idade de oito a doze semanas, foram avaliados no teste do nado forçado. **A.** A frequência de nado e **B.** O tempo de nado foram avaliados durante quatro minutos. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e estão demonstrados como a média \pm SEM (desvio padrão da média), e foram analisados usando o teste *t-student*.

Os camundongos deficientes para SOCS2 apresentaram um tempo de imobilidade significativamente maior do que os selvagens C57BL6 ($p \leq 0.01$), indicando um comportamento do tipo depressivo basal na ausência de SOCS2 (Figura 2).

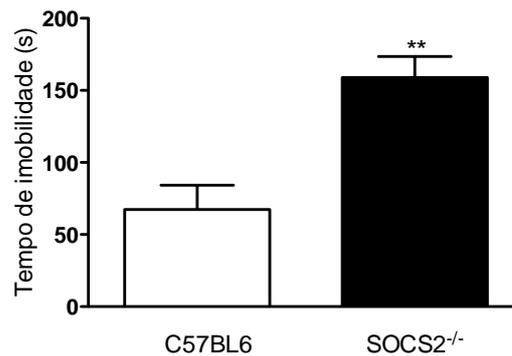


Figura 2. **Camundongos deficientes para SOCS2 apresentam comportamento do tipo depressivo em condições basais.** Camundongos deficientes para SOCS2 (SOCS2^{-/-}) e selvagens C57BL6, n= 8 por grupo, machos com idade de oito a doze semanas foram avaliados quanto ao comportamento do tipo depressivo no teste do nado forçado. O tempo total de imobilidade em segundos foi avaliado durante quatro minutos. Os dados estão representados como a média \pm SEM desvio padrão da média e foram analisados usando o teste *t-student*. ** $p \leq 0.01$

5.2. A administração de uma única dose de GBR12909 induz episódio agudo de mania em camundongos selvagens

A mania é a característica mais relevante do TB, esta reconhece-se em humano pela elevação da atividade e a energia; em camundongo isto foi avaliado pelo registro da distância percorrida no teste do campo aberto, que é a medida direta da atividade locomotora do animal. O aumento estatisticamente significativo da atividade locomotora dos camundongos que receberam GBR 12909, em relação a um grupo controle (salina); foi avaliado como hiperlocomoção e foi o indicador de comportamento de mania simulado por GBR 12909.

O teste do campo aberto foi utilizado para análise de hiperlocomoção, variável utilizada em modelos animais como indicativo de mania. A hiperlocomoção é caracterizada pelo aumento significativo da distância percorrida no teste do campo aberto. Camundongos selvagens C57BL6 apresentaram hiperlocomoção no teste do campo aberto 30 minutos (Dia 0) após a administração de uma única dose de GBR 12909, comparado aos animais controle, que receberam apenas salina (Figura 3). Não houve diferença significativa na distância percorrida 24 horas após a administração do GBR 12909, indicando uma recuperação do comportamento basal, isto é igual ao do controle.

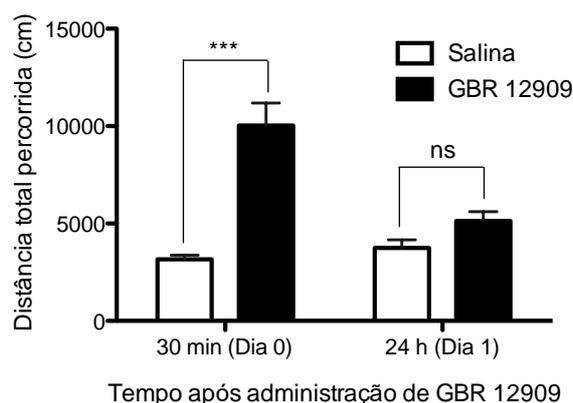


Figura 3. **Atividade locomotora em camundongos C57BL6.** Camundongos C57BL6 machos com idade de oito a doze semanas receberam GBR12909 (15mg/Kg) ou Salina no Dia 0 (30 min). A atividade locomotora foi avaliada pela distância total percorrida no teste do campo aberto durante 30 minutos nos dias 0 (logo depois da administração de GBR 12909) e 1 (24h após GBR 12909). Os dados estão representados como a média \pm SEM (desvio padrão da média) de $n=13$ são representativos de dois experimentos independentes e foram analisados usando Two-way ANOVA, seguido do teste post hoc Bonferroni. ns $p > 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

5.3. Expressão de SOCS2 no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos C57BL6 após indução de episódio agudo de mania por GBR12909.

Camundongos C57BL6 apresentaram aumento significativo da expressão de SOCS2 no hipocampo, 30 minutos e 24 horas após a administração de GBR, comparado ao grupo controle que recebeu apenas salina (Figura 4). Não houve diferença nos níveis de expressão de SOCS2 entre os tempos de 30 minutos e 24 horas após a administração do GBR (Figura 4). Não houve diferença significativa na expressão de SOCS-2 no córtex pré-frontal em todos os tempos analisados (Figura 5).

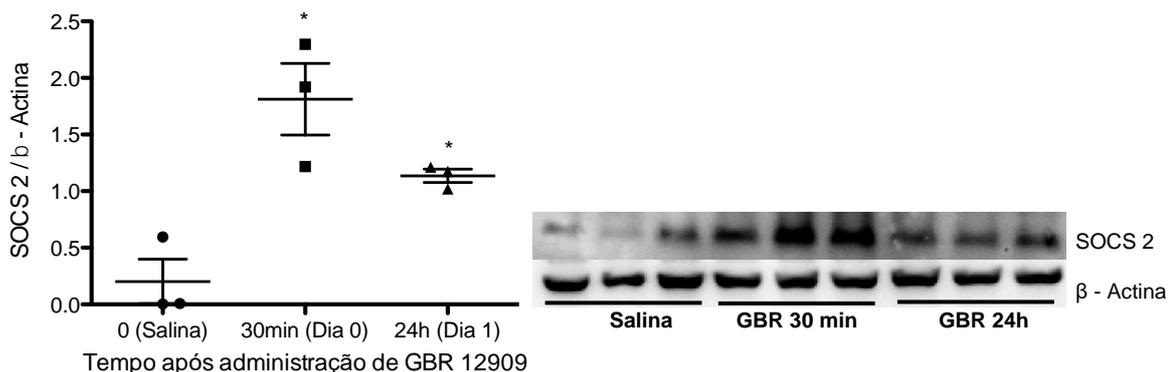


Figura 4. **Efeito do GBR 12909 na expressão de SOCS2 no Hipocampo de camundongos C57BL6.** Camundongos C57BL6 machos com idade de oito a doze semanas foram sacrificados após 30 minutos e 24 horas da administração de GBR 12909 (15mg/Kg) ou Salina. O hipocampo foi dissecado e processado para análise por western blot da expressão de SOCS2 e β -actina utilizando anticorpos específicos. A expressão de SOCS2 foi normalizada pelos níveis da proteína constitutiva β -actina e os dados foram representados como a média \pm SEM (desvio padrão da média) de $n=3$ e foram analisados usando teste t-student. * $p \leq 0.05$.

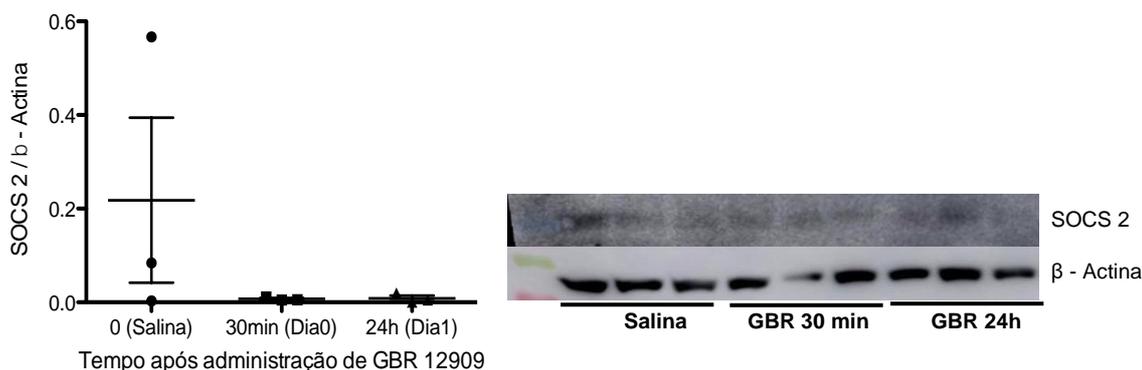


Figura 5. **Efeito do GBR 12909 na expressão de SOCS2 no Córtex prefrontal de camundongos C57BL6.** Camundongos C57BL6 machos com idade de oito a doze semanas foram sacrificados após 30 minutos e 24 horas da administração de GBR 12909 (15mg/Kg) ou Salina. O córtex pré-frontal foi dissecado e processado para análise por western blot da expressão de SOCS2 e β -actina utilizando anticorpos específicos. A expressão de SOCS2 foi normalizada pelos níveis da proteína constitutiva β -actina e os dados foram representados como a média \pm SEM (desvio padrão da média) de $n=3$ e foram analisados usando teste t-student. * $p \leq 0.05$.

5.4. Indução de episódio de Mania por GBR 12909 em camundongos SOCS2^{-/-}

A administração de uma única dose de GBR 12909 em camundongos C57BL6 e deficientes em SOCS2 resultou na hiper-locomção (Figura 6). Entretanto, os resultados demonstraram que na ausência de SOCS2 há um atraso no início da manifestação do episódio

de mania, isto é, começam a apresentar hiper-locomoção significativa 25 minutos após a administração do GBR 12909, enquanto que os animais selvagens apresentaram o mesmo comportamento previamente, com 10 minutos após a injeção do GBR12909 (Figura 6A). Além disso, os camundongos *SOCS2*^{-/-} mantiveram o comportamento de hiper-locomoção 24 horas após a administração do GBR 12909, com aumento significativo da distância percorrida já nos primeiros 15 minutos de exposição ao teste do campo aberto. Em contraste, após 24 horas da administração de GBR os camundongos selvagens apresentaram comportamento similar aos selvagens não tratados (Figura 6B).

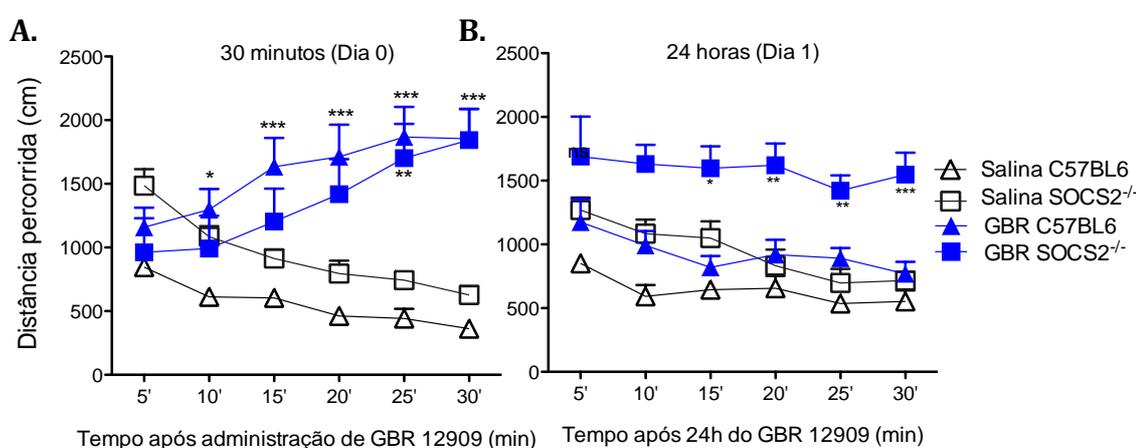


Figura 6. Deficiência de *SOCS2* resulta em atraso para apresentar o comportamento de mania induzido por GBR 12909. Camundongos selvagens C57BL6 e deficientes em *SOCS2* (*SOCS2*^{-/-}), machos com idade de oito a doze semanas receberam GBR 12909 (15mg/Kg) ou Salina no Dia 0. A atividade locomotora foi avaliada pela distância percorrida no teste do campo aberto **A.** imediatamente após a administração de GBR e **B.** 24 h após. Os dados foram representados como a média \pm SEM (desvio padrão da média) de n= 13 C57BL6 e n=5-8 para *SOCS2*^{-/-}. Os resultados foram analisados usando Two-way ANOVA, seguido de teste post hoc do Bonferroni. O(s) asterisco(s)(#) indica diferença estatística entre os grupos C57BL6 e *SOCS2*^{-/-} ambos que receberam GBR 12909, comparados com seus respectivos controle: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

5.5. Efeito do Zileuton no episódio de mania induzido por GBR 12909 em camundongos selvagens e deficientes para *SOCS2*

Para estudar o papel dos eicosanoides no comportamento simulado de mania por GBR 12909, utilizou-se o inibidor seletivo de 5-LO em animais C57BL6 e *SOCS2*^{-/-}. Os resultados demonstraram que o tratamento com Zileuton resultou na diminuição significativa da atividade locomotora dos camundongos C57BL6, mas não de *SOCS2*^{-/-}, 30 min após

administração de GBR 12909, quando comparados com seus grupos que receberam somente GBR 12909 (Figura 7). Não houve diferença na locomoção comparados C57BL6 com SOCS2^{-/-} ambos tratados com Zileuton + GBR 12909. Para o tempo de 24 horas Zileuton não apresentou nenhum efeito, ou seja, não foi observada nenhuma diferença aos fenótipos apresentados por C57BL6 e SOCS2^{-/-} que receberam apenas GBR 12909 (Figura 7).

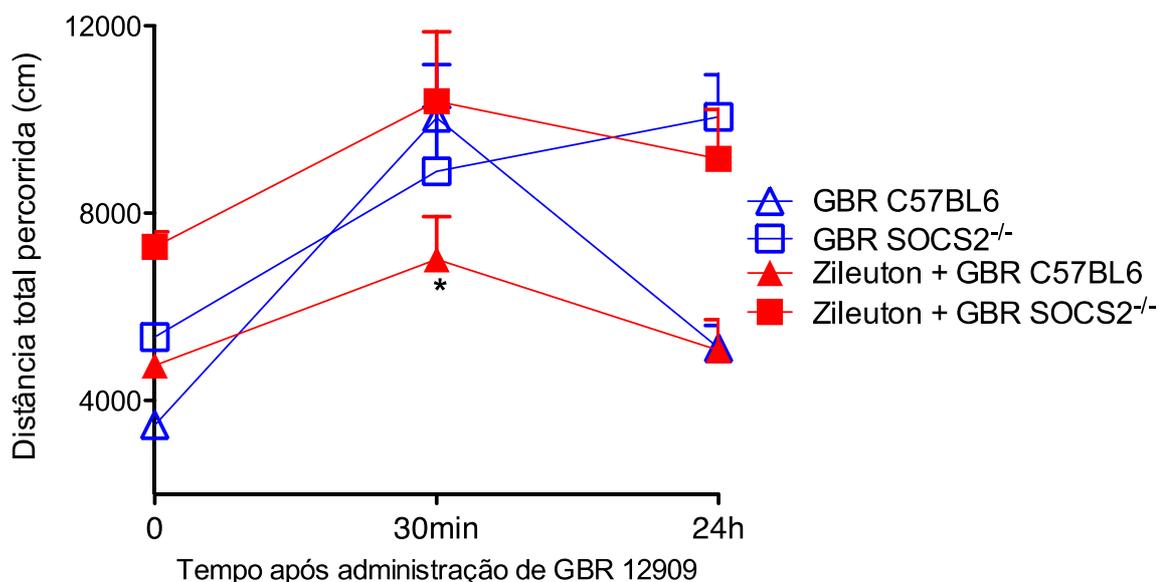


Figura 7. **O tratamento com zileuton depende de SOCS2 para reduzir o comportamento simulado de mania induzido por GBR 12909.** Camundongos selvagens C57BL6 e deficientes em SOCS2 (SOCS2^{-/-}), machos com idade de oito a doze semanas receberam GBR12909 (15mg/Kg) ou Salina (controle) no Dia 0 e Zileuton (75mg/Kg) ou veículo nos Dias -3, -2, -1, 0 e 1. A atividade locomotora foi avaliada pela distância total percorrida no teste do campo aberto durante 30 minutos nos dias 0 (logo depois da administração de GBR 12909) e 1 (24h após GBR 12909). Os dados foram representados como a média ± SEM (desvio padrão da média) de n = 5–13. Os dados foram analisados usando Two-way ANOVA seguido de teste post hoc do Bonferroni. O asterisco (*) representa a diferença estatística após administração do GBR12909 entre o grupo C57BL6 tratado com zileuton e seu grupo não tratado que só recebeu GBR 12909. * $p \leq 0.05$.

5.6. Modulação da produção de citocinas e fatores neurotróficos por SOCS2 e Zileuton em regiões do SNC associadas ao TB.

Baseado no fato de que o SOCS2 participa da regulação da produção de citocinas e fatores neurotróficos no SNC em condições fisiológicas e patológicas, investigamos se SOCS2 é capaz de modular a expressão desses mediadores em regiões do cérebro associadas ao TB (hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) após a indução do episódio de mania pela administração do GBR 12909. Avaliou-se também o efeito do tratamento com zileuton nos níveis de citocinas e fatores neurotróficos nos camundongos C57BL6 e deficientes para SOCS2.

No córtex pré-frontal não houve diferença significativa dos níveis de TNF, IFN- γ e IL-12 após 30 minutos da administração GBR 12909 quando comparado os camundongos SOCS2^{-/-} e C57BL6 (Figuras 8). Nessa região do cérebro a deficiência de SOCS2^{-/-} resultou no aumento dos níveis de IL6, IL10 e MCP1 após 30 minutos, mas não 24 horas, da administração de GBR 12909, comparado aos animais C57BL6 (Figuras 8 e 9). No córtex pré-frontal, Zileuton aumentou os níveis IL6, IL10 e MCP1 em C57BL6 (30 minutos após GBR12909 igualando aos níveis dessas citocinas encontrados em SOCS2^{-/-} tratados ou não com Zileuton (Figuras 8). Os resultados demonstraram que 24 horas após administração do GBR 12909, os SOCS2^{-/-}, mas não os C57BL6, tratados com Zileuton aumentaram os níveis de TNF e IL10 nessa região (Figuras 8 e 9).

No hipocampo após 30 minutos da administração de GBR 12909, nos animais SOCS2^{-/-}, em comparação com seus SOCS2^{-/-} salina, houve diminuição de TNF, IL6, IL10 e IL12 (Figuras 8). Não foram observadas diferenças nos níveis das citocinas, com exceção da redução de IFN γ , IL6, quando comparado C57BL6 que receberam GBR 12909 com seus controles (Figuras 8). As análises demonstraram que não houve diferenças estatísticas entre SOCS2^{-/-} e C57BL6 que receberam GBR12909, com exceção da redução de TNF. Em 24 horas não houve diferença em nenhuma citocina analisada entre todos os grupos que apenas receberam GBR 12909. No hipocampo de camundongos C57BL6, mas não de SOCS2^{-/-}, o tratamento com Zileuton resultou na diminuição dos níveis basais de todas as citocinas analisadas (Figuras 8 e 9). Zileuton diminuiu IL6 em SOCS2^{-/-} e aumentou IL12 em C57BL6, respectivamente, comparado com o tratamento apenas com GBR 12909 (após 30 minutos) (Figuras 8). Adicionalmente, os camundongos C57BL6 que receberam Zileuton apresentaram níveis maiores de TNF e IFN γ do que os SOCS2^{-/-} como mesmo tratamento, após 30 minutos da administração de GBR 12909. Os resultados demonstraram que 24 horas após administração do GBR 12909, os C57BL6, mas não os SOCS2^{-/-}, tratados com Zileuton diminuíram os níveis de TNF, IFN γ , MCP1, IL6 e IL12; tanto C57BL6 como SOCS2^{-/-} diminuíram IL10 (Figuras 8 e 9).

No estriado, não observamos diferenças nos níveis das citocinas analisadas em nenhum dos tempos quando comparados C57BL6 e SOCS2^{-/-} que receberam ou não GBR (Figuras 8 e 9). Entretanto, Zileuton reduziu os níveis basais de todas as citocinas analisadas em C57BL6 mas não nos SOCS2^{-/-} (Figuras 8 e 9). Os resultados demonstraram que 24 horas após administração do GBR 12909, os C57BL6, mas não os SOCS2^{-/-}, tratados com zileuton

diminuíram os níveis de IL6, IL10 e MCP1 (Figuras 8 e 9); SOCS2^{-/-} aumentou IFN γ (Figura 8B).

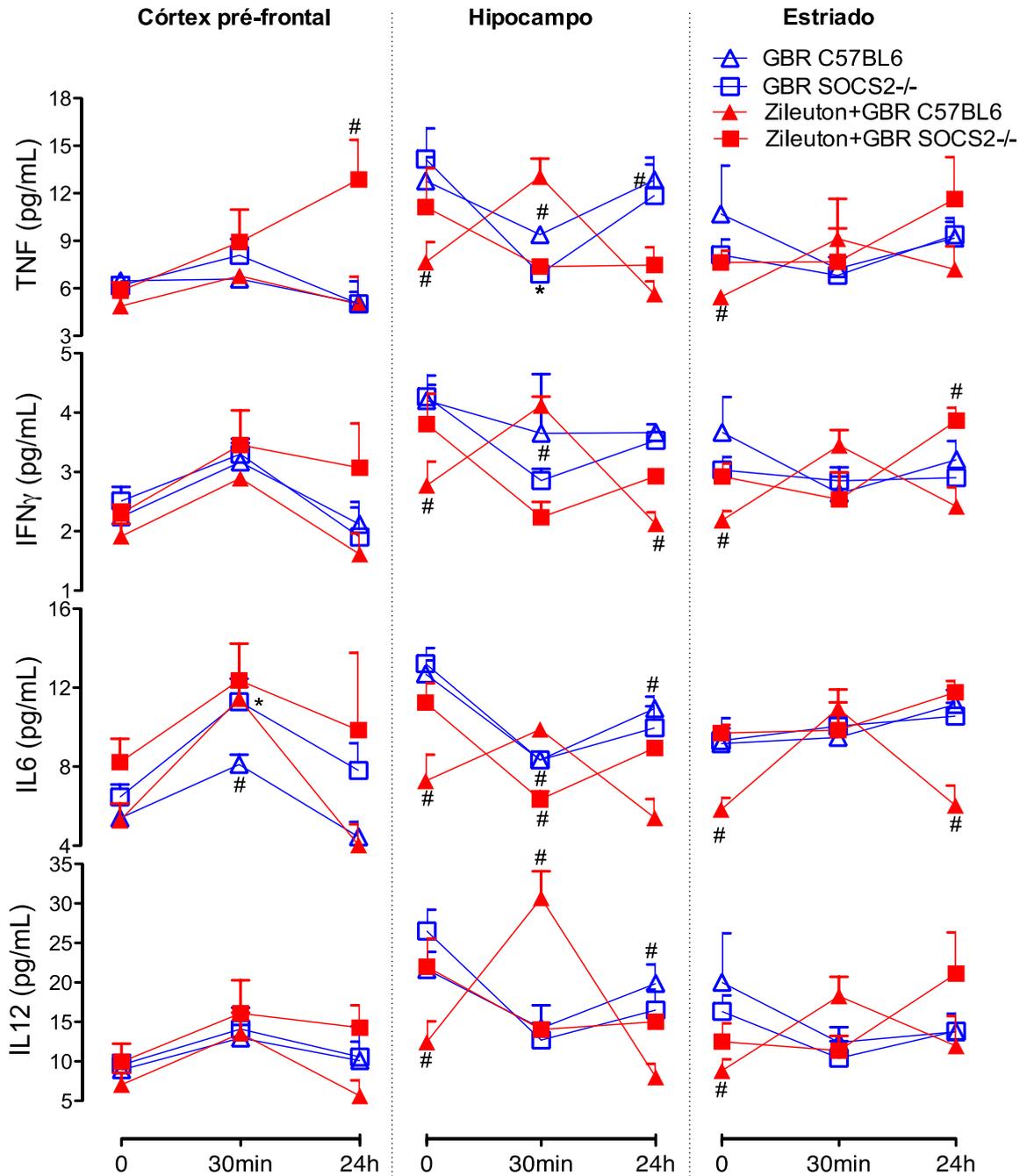


Figura 8. Níveis de citocinas inflamatórias no comportamento induzido de mania por GBR12909 em camundongos C57BL6 e SOCS2^{-/-} tratados com inibidor seletivo de 5-lipoxigenase (zileuton). Camundongos C57BL6C e SOCS2^{-/-} machos com idade de oito a doze semanas receberam GBR12909 (15mg/Kg) ou salina (controle basal) no dia 0; e Zileuton (75mg/Kg) ou veiculo (controle basal) nos Dias -3, -2, -1, 0 e 1; e foram sacrificados após 30 minutos e 24 horas da administração de GBR 12909. O córtex pré-frontal, o hipocampo e o estriado foram processados para quantificar TNF, IFN γ , IL6 e IL12 por CBA. Os dados estão representados como a média \pm SEM (desvio padrão da média) de n = 3 - 10 e foram analisados usando teste t-student ou Two-way ANOVA com post hoc Bonferroni. As diferenças quando comparados C57BL6 com SOCS2^{-/-} foram indicadas com asterisco (*) para a administração de GBR 12909 e com hashtag (#) para Zileuton.

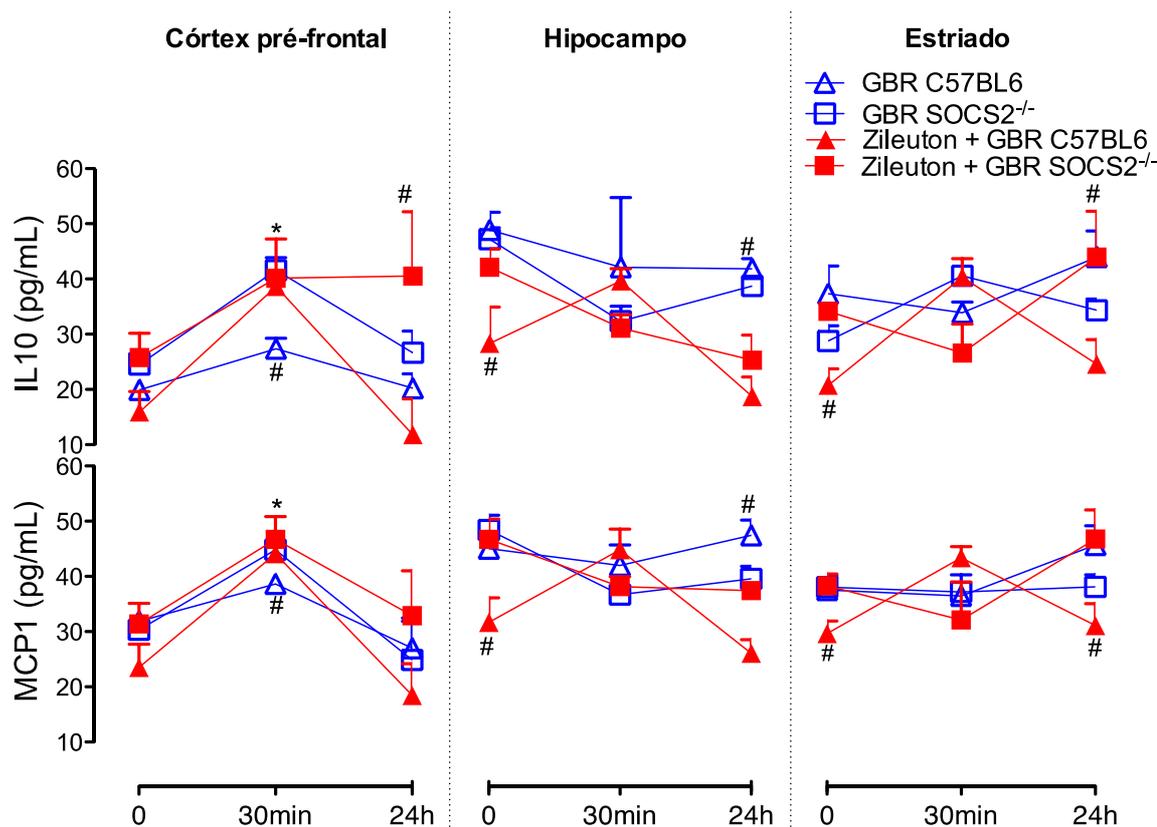


Figura 9. Níveis de IL10 e MCP1 no comportamento induzido de mania por GBR12909 em camundongos C57BL6 e SOCS2^{-/-} tratados com inibidor seletivo de 5-lipoxigenase (Zileuton). Camundongos C57BL6C e SOCS2^{-/-} machos com idade de oito a doze semanas receberam GBR12909 (15mg/Kg) ou salina (controle basal) no dia 0; e Zileuton (75mg/Kg) ou veiculo (controle basal) nos Dias -3, -2, -1, 0 e 1; e foram sacrificados após 30 minutos e 24 horas da administração de GBR 12909. O córtex pré-frontal, o hipocampo e o estriado foram processados para quantificar IL10 e MCP1 por CBA. Os dados estão representados como a média ± SEM (desvio padrão da média) de n = 3 - 10 e foram analisados usando teste t-student ou Two-way ANOVA com post hoc Bonferroni. As diferenças quando comparados C57BL6 com SOCS2^{-/-} foram indicadas com asterisco (*) para a administração de GBR 12909 e com hashtag (#) para Zileuton.

No córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dos animais C57BL6 em comparação com os SOCS2^{-/-}, com 30 minutos após administração do GBR 12909 não houve diferença nos níveis dos fatores neurotróficos (Figuras 10). Em contraste, 24 horas após a administração do GBR 12909 observou-se no córtex pré-frontal dos SOCS2^{-/-} quando comparados aos seus controles e com C57BL6 GBR 12909, uma diminuição de BDNF e GDNF, mas não de NGF (Figuras 10). No córtex pré-frontal Zileuton aumentou os níveis basais de BDNF, GDNF e NGF nos camundongos C57BL6 quando comparados com SOCS2^{-/-}. Após 30 minutos da administração do GBR 12909, C57BL6 mas não SOCS2^{-/-} tratados com Zileuton diminuíram as concentrações de BDNF, GDNF e NGF somente quando comparado com seus controles (Figuras 10). No tempo de 24 horas após a administração do GBR 12909 o tratamento com Zileuton resultou na redução dos níveis de BDNF, mas não de GDNF e NGF, em SOCS2^{-/-} quando comparado com C57BL6 (Figura 10).

Para hipocampo e estriado nenhuma diferença nos níveis dos fatores neurotróficos foi observada em C57BL6 e SOCS2^{-/-} nos tempos de 30 minutos e 24 horas após administração de GBR 12909 e/ou tratamento com Zileuton quando comparado com os grupos salina. Com exceção o GDNF foi maior no hipocampo de C57BL6 tratado com Zileuton 24 horas após administração de GBR (Figura 10).

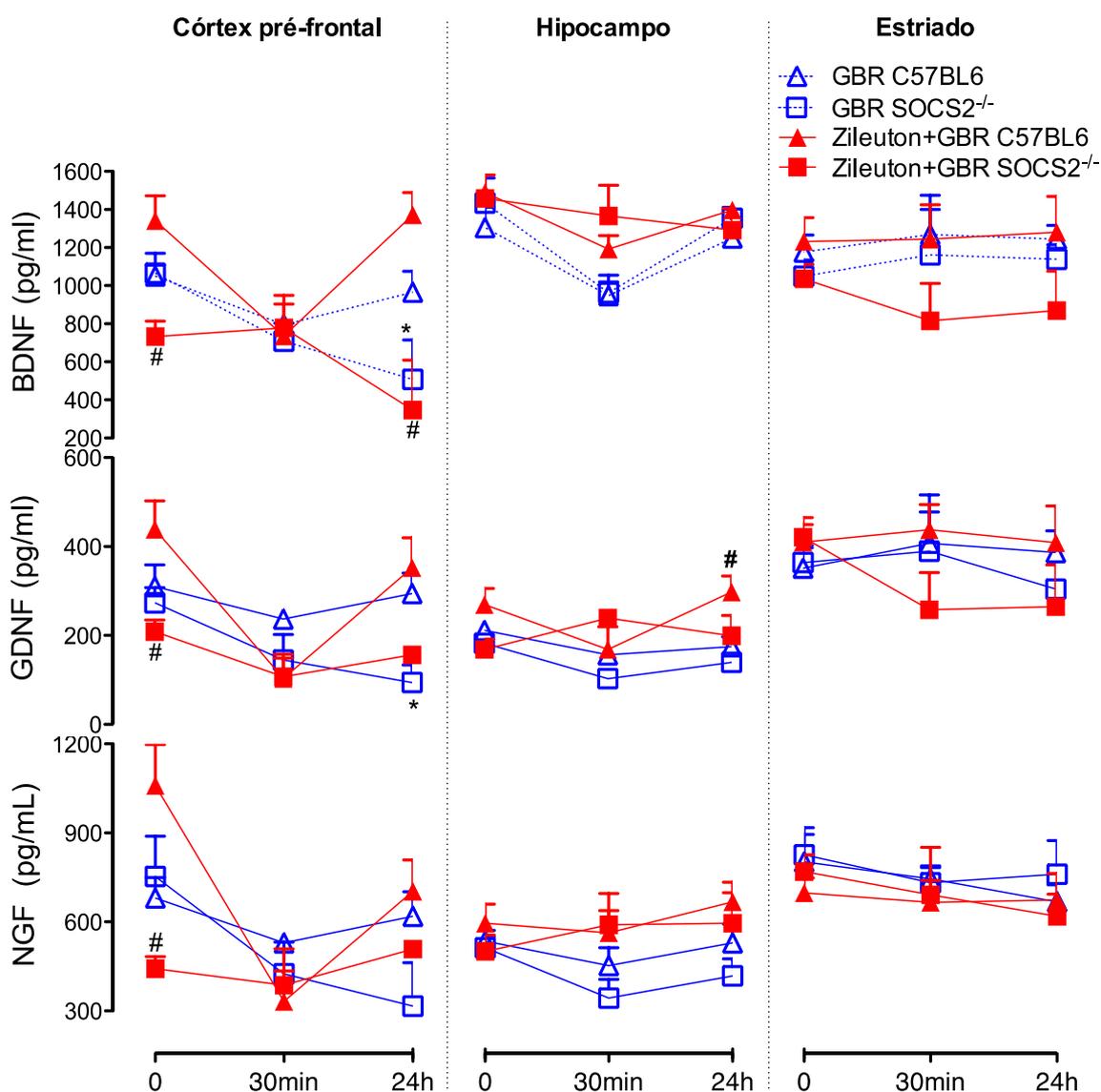


Figura 10. **Papel de Zileuton na produção de fatores neurotróficos durante o comportamento simulado de mania por GBR12909 em camundongos C57BL6 e SOCS2^{-/-}.** Camundongos selvagens C57BL6 e deficientes em SOCS2 (SOCS2^{-/-}), machos com idade de oito a doze semanas, receberam GBR12909 (15mg/Kg) ou Salina (controle basal) no Dia 0 (30 min) e Zileuton (75mg/Kg) ou veiculo (controle basal) nos Dias -3, -2, -1, 0 e 1. Foram sacrificados após 30 minutos e 24 horas da administração de GBR 12909. O córtex prefrontal, o hipocampo e o estriado foram dissecados e processados para a quantificação de BDNF, GDNF e NGF por ELISA. Os dados estão representados como a média ± SEM (desvio padrão da média) de n = 3 - 10 e foram analisados usando teste t-student ou Two-way ANOVA com post hoc Bonferroni. As diferenças quando comparados C57BL6 com SOCS2^{-/-} foram indicadas com asterisco (*) para a administração de GBR 12909 e com hashtag (#) para Zileuton.

6. DISCUSSÃO

Um dos principais resultados desta pesquisa mostrou que os camundongos deficientes para SOCS2 apresentaram um comportamento do tipo depressivo basal. Recentemente, demonstramos o papel fundamental de SOCS2 na ansiedade e déficit cognitivo durante o modelo experimental de malária cerebral causado pela infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (Brant F, 2016). Estas evidências, em conjunto com nossos novos resultados, indicam o papel de SOCS2 nos mecanismos moleculares no SNC e suas implicações na regulação do quadro depressivo e déficit cognitivo. Demonstrando que os mecanismos reguladores do comportamento estão em estreito vínculo com SOCS2. De fato, SOCS2 foi importante na homeostase do sistema nervoso central (SNC) regulando o episódio agudo de comportamento tipo mania induzido pelo fármaco GBR 12909. Essas observações são importantes uma vez que doenças como o TB, em que os episódios de depressão oscilam com os episódios de mania (Merikangas, et al., 2011), SOCS2 poderia ser, pelo menos em parte, uma molécula alvo. Portanto, esse estudo sugere, pela primeira vez, um papel de SOCS2 no TB e contribui para um melhor entendimento da fisiopatologia da doença.

A deficiência de SOCS2 confere uma resistência inicial do desenvolvimento de episódio de mania induzido por GBR 12909. Por outro lado, uma vez a mania estabelecida nesses animais, eles não são capazes de restaurar seu comportamento basal como observado nos camundongos selvagens. Sugerindo o importante vínculo/participação de SOCS2 na regulação do fenômeno de oscilação no TB.

Até onde conhecemos, na atualidade não existe um modelo experimental ideal para estudos do TB (Kato T, 2016), o que dificulta o avanço da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença e o desenvolvimento de novas terapias. Assim as estratégias experimentais utilizadas, na maioria dos estudos, permitem avaliar de forma isolada a mania e a depressão (Valvassori SS, 2013). Muitos dos modelos de mania são induzidos por fármacos como as anfetaminas que reproduzem sintomas comuns, como hiperatividade, com outras doenças psiquiátricas como, no caso da esquizofrenia (Gluck MR, 2001, Young JW et al., 2011).

A principal limitação do estudo do TB em um modelo animal é que nenhum reproduz o fenômeno de alternância entre os polos da doença. A resposta oscilatória entre depressão basal e mania após administração de GBR 12909, observada na presente pesquisa no camundongo deficiente para SOCS2, pode sugerir a hipótese de que este camundongo pode ser um potencial modelo genético de TB.

SOCS2 regula a atividade de diferentes mediadores como citocinas, fatores neurotróficos e hormônios, inibindo ou aumentando suas vias de sinalização em diferentes processos biológicos, em resposta a distintos estímulos (Rico-Bautista E et al., 2006, Knosp CA et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que camundongos deficientes para SOCS2 não apresentaram um problema intrínseco da produção de citocinas e fatores neurotróficos analisados (no seu basal), apesar de apresentarem um comportamento tipo depressivo. Sugerindo que ausência de SOCS2 pode comprometer a produção de outras moléculas e/ou ocasionar em falhas na sinalização de receptores, incluindo de citocinas e fatores neurotróficos aqui testados, e assim desenvolver o comportamento do tipo depressivo. Podemos também hipotetizar que a produção de citocinas e/ou fatores neurotróficos pode estar desregulada durante o desenvolvimento dos camundongos deficientes de SOCS2, assim sendo necessário uma análise dos níveis dessas moléculas, entre outras, iniciando desde um período pré-natal. Esses estudos serão desenvolvidos no nosso laboratório.

Logo após a indução da mania (30 minutos) os camundongos deficientes para SOCS2 apresentaram no córtex pré-frontal aumento das citocinas IL6, IL10 e MCP1. Estudos demonstraram que indivíduos com TB, durante a mania, aumentam os níveis sistêmicos das citocinas IL6, IL10 e TNF (Barbosa IG, 2014) (Munkholm K, 2013). Além disso há evidências do aumento de citocinas em estudos postmortem e no fluido cerebrospinal de indivíduos bipolares (Rao JS et al., 2010, Söderlund J et al., 2011). Apesar não observamos, no córtex pré-frontal diferença nos níveis de TNF nos SOCS2^{-/-}, no hipocampo desse animal, mas não no C57BL6, houve diminuição de TNF. Esses dados conjuntamente com observações de outros estudos que não se observou aumento nos níveis de TNF, sugerem que esta citocina é uma molécula pouco estável e pode ser degradada facilmente assim que liberada na periferia. De fato, foi demonstrado que indivíduos com transtorno bipolar em mania apresentam aumento nos níveis de sTNFR1, um dos receptores solúveis de TNF (Kronfol Z, 2000, Barbosa I G, 2012), esses receptores quando ligados ao TNF previnem a interação com os receptores de TNF da membrana celular.

Na atualidade IL10 é considerada a citocina mais importante com propriedades anti-inflamatórias e com um papel fundamental na prevenção do dano tecidual mediado por inflamação. Aumento da produção de IL10, associado as outras alterações da resposta imune, como, por exemplo, aumento de IL6, está presente em diferentes condições que envolvem o sistema nervoso; como estresse psicossocial e mental, privação do sono e depressão (Mingomataj E and Bakiri A H, 2016). Portanto, o aumento de IL10 após a administração de

GBR em camundongos deficientes de SOCS2, seria numa tentativa de inibir a resposta de citocinas pró-inflamatórias produzidas nesse contexto, por exemplo, de IL6. Essa hipótese está em consonância com o papel demonstrado de IL10 no controle da resposta imune (Mingomataj E and Bakiri A H, 2016). O aumento de IL10 também já foi descrito em indivíduos com TB em comparação com controles (Kunz M, 2011), porém é preciso estudos adicionais para estabelecer o papel dessa citocina nos diferentes estados de humor da doença. No mesmo sentido é de ressaltar a importância de desenvolver pesquisas sobre componentes de vias de sinalização envolvidas com respostas de citocinas, incluindo SOCS2 em pacientes com TB.

A importância da modulação da produção de citocinas por SOCS2 no SNC foi também demonstrada por nosso grupo no contexto de doenças infecciosas. Durante a infecção experimental por *Toxoplasma gondii*, demonstramos uma exacerbação da resposta pró-inflamatória no SNC com aumento da produção de TNF e atividade da óxido nítrico sintase induzida (NOS2), o que resultou na morte dos camundongos deficientes de SOCS2 (Machado FS and Aliberti J, 2006). Durante a infecção por *P. berghei* Anka, a ausência de SOCS2, apesar de postergar; i) produção de citocinas pró-inflamatórias e ii) progressão dos sinais clínicos da doença, resulta durante a fase mais tardia em doença mais severa associada ao aumento da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL17, e redução da produção de BDNF (Brant F, 2016). Além disso, a ausência de SOCS2 também resultou na redução de citocinas pró-inflamatórias no SNC no início da infecção com Herpes Simplex Type 1 virus (HSV-1) (Cunha LF et al., 2016), entretanto, experimentos adicionais são necessários para avaliar a consequência da deficiência de SOCS2 na fase tardia dessa infecção.

Em relação aos fatores neurotróficos, estudos demonstraram que pacientes com TB durante a mania apresentam níveis reduzidos de BDNF e GDNF (Barbosa IG; Huguet RB; Sousa LP; Abreu MNS; RochaNP; Bauer ME; et al, 2011, Munkholm K and 2016). Entretanto, estudos detectaram aumento na concentração de BDNF no TB, essas informações contrastantes poderiam ser explicadas devido o percurso da doença (tempo que foi analisado) e/ou efeitos do tratamento farmacológico na produção desse fator nos diferentes pacientes (Barbosa IG, 2013b, Munkholm K and 2016). De forma consistente com as evidências de diminuição dos fatores neurotróficos em pacientes com TB, nossos achados demonstraram diminuição de BDNF e GDNF nos camundongos deficientes em SOCS2, durante o episódio induzido de mania por GBR (após 24 horas), associado a falta de resolução desse

comportamento. Sugerindo uma importante contribuição de SOCS2 na regulação da produção de BDNF durante os episódios de mania.

Não detectamos alterações nos níveis de NGF nos camundongos SOCS2^{-/-} após a administração do GBR 12909. Apesar, do NGF ser menos estudado na parte clínica do TB do que o BDNF, relatos sobre a sua função são contraditórios e limitados. Recentemente, Rao e colaboradores relataram que pacientes em mania não apresentaram diferenças nos níveis sanguíneos de NGF, quando comparados com controles. Esses autores sugeriram que análises cuidadosas são necessárias sobre esta neurotrofina, já que o NGF poderia ser apenas um efeito secundário não relacionado com os mecanismos fisiopatológicos do transtorno bipolar (Rao S, 2017). De fato, algumas publicações relataram a diminuição dos níveis plasmáticos de NGF durante a mania em comparação com indivíduos saudáveis.

A diminuição dos fatores neurotróficos observada nos camundongos deficientes em SOCS2 após 24 horas da indução do episódio de mania, contrastada com o aumento das concentrações de citocinas no tempo de 30 minutos, sugerem que as citocinas regulam os níveis desses fatores neurotróficos. De fato, esse fenômeno também foi observado em outros estudos, onde a cinética de produção de citocinas é anterior a produção de fatores neurotróficos (Aloe L, 1999, Spooren A, 2011). Por exemplo, foi encontrada uma correlação negativa entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL6 e TNF, com os níveis de BDNF e NGF durante o, modelo experimental de malária cerebral causada pela infecção por *P. berghei* Anka (Miranda AS, 2015).

Poucos estudos sobre os níveis de mediadores da inflamação em modelos animais de mania foram publicados até hoje. No modelo de mania induzido pelo GBR 12909 demonstraram alterações do estresse oxidativo, diminuição da glutathiona reduzida (GSH) e aumento da peroxidação lipídica no cérebro de camundongo Swiss, alterações essas semelhantes as observadas em humano. Ambas as alterações foram revertidas pela administração de lítio (Queiroz AI, 2015). No modelo induzido por dextroanfetamina houve aumento de IL4, IL6, IL10 e TNF, que também foi revertido com a administração de lítio (Valvassori SS, 2015). Em contraste, na hiperlocomoção induzida por ouabaína em rato Wistar não foi observado o perfil inflamatório observado na clínica, pelo contrário ocorreu diminuição de IL6 e sem alteração de TNF e IL10 (Tonin PT et al., 2014).

Paralelamente outras pesquisas sobre os níveis de BDNF em rato Wistar em modelo de mania por administração crônica de anfetamina, encontraram aumento da expressão de mRNA para BDNF no córtex pré-frontal e na amígdala e diminuição no hipocampo (Fries GR, 2015). Estes resultados de Fries e colaboradores, devem ser interpretados com cautela;

considerando que o BDNF é sintetizado como precursor pro-BDNF (p-BDNF) e depois modificado a sua forma madura (mBDNF). Os pBDNF e mBDNF apresentam funções opostas: o pBDNF age no receptor p75 iniciando a apoptose ou encurtando os neurônios; enquanto o mBDNF tem afinidade pelo seu receptor TrkB que media a neuroplasticidade e sobrevivência (Maletic V, 2014).

Em síntese, foram sugeridos e discutidos até este ponto importantes papéis de SOCS2 durante o TB, indicando poder ser uma das proteínas/moléculas alvo na fisiopatologia dessa doença. Principalmente, sugerindo que a associação entre o comportamento alterado no TB e uma resposta imuno-inflamatória concomitante, ocorre através de mecanismos regulados por SOCS2.

SOCS2, como mencionado anteriormente, é induzido por fatores anti-inflamatórios, principalmente por eicosanoides como as LXAs (Machado FS, 2006). A enzima chave na produção de lipoxinas é a 5-LO, que também está envolvida na produção de leucotrienos que exercem atividade inflamatória.

Diferentes doenças ocorrem como consequência da atividade de leucotrienos como em asma (Israel E et al., 1990). Estes mediadores lipídicos promovem uma resposta inflamatória através do recrutamento de neutrófilos, síntese de quimiocinas, aderência endotelial, ativação de leucócitos, contração de músculo liso, dentro dos mecanismos clássicos (Pian P et al., 2013). Estudos recentes associaram a desregulação de leucotrienos com doenças cardiovasculares como infarto, isquemia e aterosclerose. Por outro lado pesquisas em doenças que se apresentam com aumento da atividade imuno-inflamatória, encontraram que a inibição seletiva de 5-lipoxigenase por Zileuton promove uma resposta anti-inflamatória com potencial uso como tratamento de acne, dor inflamatório, isquemia cerebral, lesão por reperfusão (Pian P et al., 2013). Os mecanismos que explicam os benefícios do Zileuton nestas doenças é pela inibição da produção de leucotrienos (Silva BC et al., 2015).

Diferentes doenças ocorrem como consequência da atividade de leucotrienos como em asma (Israel E et al., 1990). Estes mediadores lipídicos promovem uma resposta inflamatória através do recrutamento de neutrófilos, síntese de quimiocinas, aderência endotelial, ativação de leucócitos e contração de músculo liso. Estudos recentes associaram a desregulação da produção de leucotrienos com doenças cardiovasculares como infarto, isquemia e aterosclerose (Pian P et al., 2013). Também foi demonstrado que a inibição seletiva de 5-LO por Zileuton, reduz a produção de leucotrienos promovendo uma resposta anti-inflamatória, com potencial uso no tratamento de acne, dor, isquemia cerebral e lesão por reperfusão (Silva BC et al., 2015, Kwak H et al., 2010).

Demonstramos aqui pela primeira vez, até onde é do nosso conhecimento, o efeito profilático do tratamento com Zileuton no desenvolvimento do comportamento tipo mania, semelhante aos sintomas do TB. Tratamento com Zileuton inibiu o desenvolvimento do comportamento de mania induzido por GBR12909 de maneira dependente de SOCS2. De fato, camundongos deficientes de SOCS2 não responderam ao tratamento com Zileuton apresentando o mesmo fenótipo anteriormente relatado de mania (demora na sua indução e falta de controle na sua resolução). Hipotetizamos que Zileuton preveniu a indução do comportamento tipo mania em selvagens, mas não em SOCS2^{-/-}, provavelmente por ter aumentado os níveis basais dos fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e NGF) no córtex pré-frontal e diminuído os níveis de citocinas no hipocampo e estriado. Essa redução poderia ser consequência da inibição da produção de leucotrienos. Entretanto, são necessários experimentos adicionais para confirmar essa hipótese e, de grande relevância, identificar os mecanismos envolvidos os quais serão investigados durante o meu doutoramento.

Após 24 horas da administração de GBR 12909, diferente dos camundongos selvagens, os deficientes em SOCS2 tratados com Zileuton ainda apresentaram níveis elevados de citocinas. Esses resultados reforçam a hipótese do papel crucial de SOCS2 para regular as respostas induzidas por eicosanoides, incluindo lipoxinas e leucotrienos. Experimentos adicionais de dosagens desses eicosanoide, como mencionado anteriormente, são necessários para confirmar a nossa hipótese de que SOCS2 é essencial no controle da sinalização de metabolitos derivados da atividade da enzima 5-LO os quais, possivelmente, são importantes no controle da oscilação de humor encontrado no TB.

Trabalhos demonstraram que medicamentos testados no TB como o lítio, ácido valpróico e carbamazepina diminuíram o metabolismo de conversão de ácido araquidônico (AA) em certos produtos da ação de enzimas específicas como a ciclooxigenase (COX) 1 e 2 e fosfolipase A2 citosólica (cPLA2). Entretanto, nesses estudos, as expressões de 5-LO e de leucotrienos não foram alteradas (Bosetti F1 et al., 2003 , Rao JS et al., 2008). Também foi demonstrado em estudo (posmortem) de cérebros de pacientes bipolares alterações da cascata do AA no córtex frontal, incluindo aumento da expressão de COX2 e de prostaglandina E sintase de membrana (mPGES). Além da redução de COX1 e PGES citosólica (cPGES), não foi observada diferença nos níveis de 5-, 12-, e 15-LO, tromboxano sintase e epoxigenase do citocromo e citocromo p450 (Kim H-W et al., 2011). Importante, salientar estudos apenas das análises das expressões de enzimas envolvidas no metabolismo do AA são suficientes para concluir sobre a participação de eicosanoides, como a LXA e leucotrienos no TB. De fato,

esses eicosanoides são produzidos e atuam no mesmo local, caso contrário, seriam degradados antes mesmo das suas ações.

7. CONCLUSÕES

SOCS2 controla o desenvolvimento dos comportamentos do tipo depressivo e mania experimental induzido por GBR, regulando os níveis de fatores neurotróficos no córtex pré-frontal e de citocinas no córtex pré-frontal e também no hipocampo e estriado. Zileuton, inibidor da atividade da 5-LO, previne o comportamento de tipo mania experimental de forma dependente de SOCS2.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar os níveis de leucotrienos e lipoxinas em camundongos C57Bl6 e SOCS2-/- nos comportamentos de tipo depressão e mania experimental
- Investigar a participação dos receptores de leucotrienos e lipoxinas no desenvolvimento dos comportamentos de tipo depressão e mania experimental
- Estudar o fenômeno de oscilação e duração entre os comportamentos de tipo depressão e mania experimental na ausência de SOCS2
- Definir se camundongo deficiente de SOCS2 seria um modelo apropriado para validar estudos do transtorno bipolar; incluindo novas análises de validade de constructo, face e predição.
- Avaliar os tipos celulares no sistema nervoso central, residentes e/ou infiltrantes, são responsáveis pelas alterações imunes, neurotróficas e comportamentais observadas.
- Avaliar os níveis de expressão de SOCS2 em indivíduos com TB.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDA M 2015. Lithium in the treatment of bipolar disorder: Pharmacology and pharmacogenetics. *Mol Psychiatry*, 20, 661-670.
- ALEXANDER WS & HILTON DJ 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol*, 22, 503–529.
- ALOE L, P. F., PROBERT L, AKASSOGLU K, KASSIOTIS G, MICERA A, FIORE M, 1999. Learning abilities, NGF and BDNF brain levels in two lines of TNF-alpha transgenic mice, one characterized by neurological disorders, the other phenotypically normal. *Brain Res* 840, 125–137.
- AMERICAN-PSYCHIATRIC-ASSOCIATION 2013. Bipolar and related disorders. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5 ed. Arlington, VA,.
- ANDERSON G, M. M. 2015. Bipolar Disorder: Role of immune-inflammatory cytokines, oxidative and nitrosative stress and tryptophan catabolites. *Curr Psychiatry Rep*, Advance online publication, DOI 10.1007/s11920-014-0541-1.
- ANDREAZZA AC, FREY BN, ERDTMANN B, SALVADOR M, ROMBALDI F, SANTIN A & ET.AL 2007. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Research*, 153, 27-32.
- ANGST J, M. A. 2001. Bipolarity from ancient to modern times: conception, birth and rebirth. *Journal of Affective Disorders* 67 3–19.
- BANDEIRA-MELO C, BOZZA PT, DIAZ BL, CORDEIRO RS, JOSE PJ, MARTINS MA & ET AL. 2000 Cutting edge: lipoxin (LX) A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 block allergen-induced eosinophil trafficking. *J Immunol*, 164, 2267-2271.
- BARBOSA I G. 2012. *Avaliação de fatores neurotróficos e marcadores imunológicos em indivíduos com transtorno bipolar*. Doutorado Universidade Federal de Minas Gerais.
- BARBOSA IG, M.-V. R., SOARES JC, TEIXEIRA AL, 2014. The Immunology of Bipolar Disorder. *Neuroimmunomodulation* 21, 117–122.
- BARBOSA IG, R. N., BAUER ME, MIRANDA AS, HUGUET RB, REIS HJ, ET AL 2013a. Chemokines in bipolar disorder: trait or state? . *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 263, 159-165.
- BARBOSA IG, R. N., MIRANDA AS, HUGUET RB, BAUER ME, REIS HJ, ET AL. 2013b. Increased BDNF levels in long-term bipolar disorder patients. *Rev Bras Psiquiatr* 2013, 35, 67–69.
- BARBOSA IG; HUGUET RB; SOUSA LP; ABREU MNS; ROCHANP; BAUER ME; ET AL 2011. Circulating levels of GDNF in bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 502 103–106.
- BARNETT JH & SMOLLER JW 2009. The genetics of bipolar disorder. *Neuroscience* 164, 331–343.
- BASRAI HS, TURBIC A, CHRISTIE KJ & TURNLEY AM 2016. Suppressor of Cytokine Signalling 2 (SOCS2) Regulates Numbers of Mature Newborn Adult Hippocampal Neurons and Their Dendritic Spine Maturation. *Cell Mol Neurobio* DOI 10.1007/s10571-016-0427-3.
- BEYER JL & KRISHNAN KR 2002. Volumetric brain imaging findings in mood disorders. *Bipolar Disord* 4, 89–104.
- BIENVENU OJ, D. D., KENDLER KS, 2011. Psychiatric “diseases” versus behavioral disorders and degree of genetic influence. *Psychol Med*, 41, 33-40.
- BK, T. 2012. The severity of mental disorders is linked to interaction among candidate genes. *Integr Biol (Camb)*, 4, 1096–1101.

- BLOND BN, FREDERICKS CA & BLUMBERG HP 2012. Functional neuroanatomy of bipolar disorder: structure, function, and connectivity in an amygdala-anterior paralimbic neural system. *Bipolar Disord* 14, 340–355.
- BOSETTI F1, WEERASINGHE GR, ROSENBERGER TA & RAPOPORT SI 2003 Valproic acid down-regulates the conversion of arachidonic acid to eicosanoids via cyclooxygenase-1 and -2 in rat brain. *J Neurochem*, 85, 690-696.
- BOYD J G, G. T. 2003. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol*, 27, 277-324.
- BRANT F, M. A., ESPER L, GUALDRÓN-LÓPEZ M, CISALPINO D, SOUZA DG, 2016. Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. *Brain, Behavior, and Immunity* 54, 73–85.
- CAN A, D. D., ARAD M, TERRILLION C E, PIANTADOSI S C, GOULD T D, 2012. The Mouse Forced Swim Test. *J Vis Exp*, 3638.
- CARTER CJ 2007a. eIF2B and oligodendrocyte survival: where nature and nurture meet in bipolar disorder and schizophrenia? . *Schizophr Bull* 33, 1343–1353.
- CARTER CJ 2007b. Multiple genes and factors associated with bipolar disorder converge on growth factor and stress activated kinase pathways controlling translation initiation: implications for oligodendrocyte viability. *Neurochem Int* 50.
- CLISH CB, O'BRIEN JA, GRONERT K, STAHL GL, PETASIS NA & CN, S. 1999 Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8247-8252.
- COSGROVE VE, KELSOE JR & SUPPES T 2016. Toward a Valid Animal Model of Bipolar Disorder: How the Research Domain Criteria Help Bridge the Clinical-Basic Science Divide. *Biol Psychiatry*, 79, 62-70.
- CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM, L. S., RIPKE S, NEALE BM, FARAONE SV, PURCELL SM, ET AL 2013. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet* 45, 984-994.
- CUNHA LF, RACHID MA, LIMA GK, MIRANDA AS, VILELA MC, QUEIROZ NL & AL, E. 2016. Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) contributes to encephalitis in a model of herpes infection in mice. *Brain Research Bulletin* 127, 164–170.
- DANIELE S, DA POZZO E, ABELLI M, PANIGHINI A, PINI S, GESI C & AL, E. 2012. Platelet uptake of GABA and glutamate in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 14, 301–308.
- DENNIS EA & NORRIS PC 2015 Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 15, 511–523.
- DREVETS WC, P. J., FUREY ML, 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*, 213, 98-118.
- EINAT H 2006. Modelling facets of mania--new directions related to the notion of endophenotypes. *Journal of Psychopharmacology*, 20, 714-722.
- EL-MALLAKH RS, HARRISON LT, LI R, CHANGARIS DG & LEVY RS 1995. An animal model for mania: preliminary results. *Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 19, 955-962.
- FIORINO DF & PHILLIPS AG 1999. Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after D-amphetamine-induced behavioral sensitization. *J Neurosci*, 19, 456-463.

- FRIES GR, V. S., BOCK H, STERTZ L, VIEIRA DA SILVA MAGALHÃES P, MARIOT E, ET AL 2015. Memory and brain-derived neurotrophic factor after subchronic or chronic amphetamine treatment in an animal model of mania *Journal of Psychiatric Research*, 68, 329-336.
- GELLER B, B. J., TILLMAN R, CHRISTIAN SL, BOLHOFNER K, COOK EH JR, 2004. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Am J Psychiatry*, 161, 1698-1700.
- GHEDIM FV, FRAGA DDE B, DEROZA PF, OLIVEIRA MB, VALVASSORI SS, STECKERT AV & ET AL 2012. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *Journal of Psychiatric Research*, 46, 1569–1575.
- GLUCK MR, M. L., JAYATILLEKE E, HOGAN KA, MANZINO L, SONSALLA PK, 2001. Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. *Journal of Neurochemistry*, 79.
- GOLDSTEIN BI, KEMP DE, SOCZYNSKA JK & MCINTYRE RS 2009. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psychiatry*, 70, 1078–1090.
- GONZALEZ R 2014. The relationship between bipolar disorder and biological rhythms. *J Clin Psychiatry* 75:e, 323–331.
- GOULD TD & EINAT H 2007. Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31, 825-831.
- GRANDE I, KAPCZINSKI F, STERTZ L, COLPO GD, KUNZ M, CERESER KM & ET AL. 2012. Peripheral brain-derived neurotrophic factor changes along treatment with extended release quetiapine during acute mood episodes: an open-label trial in drug-free patients with bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 46, 1511–1514.
- GUTIERREZ-ROJAS L, G. M., AYUSO-MATEOS JL, GUTIERREZ-ARIZA JA, RUIZ-VEGUILLA, M, JURADO D, 2008. Quality of life in bipolar disorder patients: a comparison with a general population sample. *Bipolar Disord*, 10 625–634.
- HACHICA M, POULIOT M, PETASIS NA & SERHAN CN 1999 Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1alpha-initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J Exp Med*, 189, 1923-1930.
- HU Y, R. S. J. 2008. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J. Neurochem*, 105, 1-17.
- ISRAEL E, DERMARKARIAN R, ROSENBERG M, SPERLING R, TAYLOR G, RUBIN P & DRAZEN JM 1990. The Effects of a 5-Lipoxygenase Inhibitor on Asthma Induced by Cold, Dry Air *N.Engl. J. Med.*, 323, 1740–1744.
- KARANTI A, KARDELL M, LUNDBERG U & LANDÉN M 2016. Changes in mood stabilizer prescription patterns in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*, 195, 50-56.
- KATO T, K. T., KUBOTA-SAKASHITA M, KATO TM, NAKAJIMA K, 2016. Animal models of recurrent or bipolar depression. *Neuroscience*, 321, 189-196.
- KENDLER KS, T. L., GARDNER CO, 2001. Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *American Journal of Psychiatry*, 158.

- KESSING LV, A. P. 2005. Predictive effects of previous episodes on the risk of recurrence in depressive and bipolar disorders. *Current Psychiatry Reports*, 7.
- KESSING LV, A. P., MORTENSEN PB, BOLWIG TG, 1998. Recurrence in affective disorder. I. Case register study. . *British Journal of Psychiatry*, 172 23-28.
- KIM H-W, RAPOPORT SI & RAO JS 2011. Altered arachidonic acid cascade enzymes in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Molecular Psychiatry* 16, 419–428.
- KNOSP CA, CARROLL HP, ELLIOTT J, SAUNDERS SP, NEL HJ, AMU S & AL, E. 2011. SOCS2 regulates T helper type 2 differentiation and the generation of type 2 allergic responses. *J. Exp. Med*, 208, 1523–1531.
- KOFMAN O, LI PP & WARSH JJ 1998. Lithium, but not carbamazepine, potentiates hyperactivity induced by intra-accumbens cholera toxin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59, 191–200.
- KRAEPELIN E 1899. Manic-depressive insanity and paranoia. *Edinburgh: E. & S. Livingstone*.
- KRONFOL Z, R. D. 2000. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, 157, 683-694.
- KUNZ M, C. K. M., GOI P D, FRIES G R, TEIXEIRA A L, FERNANDES B S, ET AL 2011. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Rev. Bras. Psiquiatr*, 33 268-274.
- KWAK H, PARK K, CHOI H, LIM H, PARK J & PARK H 2010. The cardioprotective effects of zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor, are mediated by COX-2 via activation of PKC δ . *Cellular Signalling*, 22, 80–87.
- LALA SV, S. M. 2012. Medical and psychiatric comorbidities among elderly individuals with bipolar disorder: a literature review. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 25, 20–25.
- MACHADO FS & ALIBERTI J 2006. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res*, 35, 209–218.
- MACHADO FS, JONHDROW JE, ESPER L, DIAS A, BAFICA A, SERHAN C & AL, E. 2006. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nature Medicine*, 12, 330-334.
- MACHADO FS, J. J., ESPER L, DIAS A, BAFICA A, SERHAN C, ET AL, 2006. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nature Medicine*, 12, 330-334.
- MALETIC V & RAISON C 2014. Integrated neurobiology of bipolar disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 5, 98 (1-24).
- MALETIC V, R. C. 2014. Integrated neurobiology of bipolar disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 5, 98 (1-24).
- MANJI HK, M. G., RAJKOWSKA G , CHEN G 2000. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Molecular Psychiatry*, 5, 578–593.
- MCCLUNG CA 2011. Circadian rhythms and mood regulation: insights from pre- clinical models. *European Neuropsychopharmacology*, 21 S683–S693.
- MCINTYRE RS, KONARSKI JZ & LN, Y. 2014. Comorbidity in bipolar disorder: a framework for rational treatment selection. *Hum Psychopharmacol* 19, 369-386.
- MCINTYRE RS, MUZINA DJ, KEMP DE, BLANK D, WOLDEYOHANNES HO, LOFCHY J & AL., E. 2008. Bipolar disorder and suicide: research synthesis and clinical translation. *Curr Psychiatry Rep*, 10, 66-72.
- MILHIET V, BOUDEBESSE C, BELLIVIER F, DROUOT X, HENRY C, LEBOYER M & ET AL. 2014. Circadian abnormalities as markers of susceptibility in bipolar disorders. *Front Biosci (Schol Ed)* 6, 120–137.

- MILHIET V, ETAIN B, BOUDEBESSE C & BELLIVIER F 2011. Circadian biomarkers, circadian genes and bipolar disorders. *J Physiol Paris* 105, 183–189.
- MINGOMATAJ E & BAKIRI A H 2016. Regulator Versus Effector Paradigm: Interleukin-10 as Indicator of the Switching Response. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 50, 97-113.
- MIRANDA AS, B. F., CAMPOS AC, VIEIRA LB, ROCHA NP, CISALPINO ED, ET AL 2015. Evidence for the contribution of adult neurogenesis and hippocampal cell death in experimental cerebral malaria cognitive outcome. *Neuroscience* 284, 920–933.
- MOUSA A, B. M. 2013. Role of Cytokine Signaling during Nervous System Development. *Int J Mol Sci.* , 14, 13931–13957.
- MUNEER A 2016. The Neurobiology of Bipolar Disorder: An Integrated Approach. *Chonnam Med J*, 52, 18-37.
- MUNKHOLM K, V. M., KESSING L V, 2013. Cytokines in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders* 144 16–27.
- MUNKHOLM K, V. M., KESSING LV, & 2016. Peripheral blood brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 21, 216-228.
- MYINT A M & KIM Y K 2014. Network beyond IDO in Psychiatric Disorders: Revisiting Neurodegeneration Hypothesis. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 48, 304-313.
- NURNBERGER JI JR, KOLLER DL, JUNG J, EDENBERG HJ, FOROUD T, GUELLA I & AL, E. 2014. Identification of pathways for bipolar disorder: a meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 71, 657-664.
- O'DONNELL KC & GOULD TD 2007. The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31, 932–962.
- PADMOS RC, HILLEGERS MH, KNIJFF EM, VONK R, BOUVY A, STAAL FJ & ET AL. 2008. A discriminating messenger RNA signature for bipolar disorder formed by an aberrant expression of inflammatory genes in monocytes. *Arch Gen Psychiatry* 65, 395–407.
- PADMOS RC, V. B. G., VONK R, WIJKHUIJS AJ, KAHN RS, NOLEN WA, ET AL, 2009. Genetic and environmental influences on pro-inflammatory monocytes in bipolar disorder: a twin study. *Arch Gen Psychiatry*, 66, 957-965.
- PERRY W, M. A., PAULUS M, YOUNG J, KINCAID M, FERGUSON E, ET AL 2009. A reverse translational study of dysfunctional exploration in psychiatric disorders: from mice to men. *Arch Gen Psychiatry*, 66, 1072-1080.
- PHILLIPS ML, TRAVIS MJ, FAGIOLINI A & KUPFER DJ 2008. Medication effects in neuroimaging studies of bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 165, 313–320.
- PHILLIPS ML, F. E. 2006. Redefining bipolar disorder: toward DSM-V. *Am J Psychiatry*, 163, 1135-1136.
- PIAN P, LABOVITZ E, HOFFMAN K, CLAVIJO CF, LYNN RR, GALINKIN JL, VINKS AA, MALIK P & U, C. 2013. Quantification of the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton in human plasma using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 937, 79–83.
- POO M 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, 2, 24-32.
- PORSOLT RD, P. M., JALFRE M, 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 730-732.
- POST RM 1992. Post RM. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *American Journal of Psychiatry* 149, 999-1010.

- POST RM 2007. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31, 858-873.
- POST RM 2009. Childhood-onset bipolar disorder. The perfect storm. *Psychiatric Annals*, 39, 879-886.
- QUEIROZ AI, D. A. M., DA SILVA ARAÚJO T, DE SOUZA GC, CAVALCANTE LM, DE JESUS SOUZA MACHADO M, ET AL 2015 GBR 12909 administration as an animal model of bipolar mania: time course of behavioral, brain oxidative alterations and effect of mood stabilizing drugs. *Metab Brain Dis*, 5, 1207-1215.
- RALPH-WILLIAMS RJ, PAULUS MP, ZHUANG X, HEN R & GEYER MA 2003. Valproate attenuates hyperactive and perseverative behaviors in mutant mice with a dysregulated dopamine system. *Biological Psychiatry*, 53, 352-359.
- RAMSTEDT U, NG J, WIGZELL H, SERHAN CN & SAMUELSSON B 1985. Action of novel eicosanoids lipoxin A and B on human natural killer cell cytotoxicity: effects on intracellular cAMP and target cell binding. *J Immunol*, 135, 3434-3438.
- RANSOME MI, GOLDSHMIT Y, BARTLETT PF, WATERS MJ & AM, T. 2004. Comparative analysis of CNS populations in knockout mice with altered growth hormone responsiveness. *European Journal of Neuroscience*, 19, 2069-2079.
- RAO JS, HARRY GJ, RAPOPORT SI & KIM H-W 2010. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. *Mol Psychiatry*, 15, 384-392.
- RAO JS, LEE HJ, RAPOPORT SI & BAZINET RP 2008. Mode of action of mood stabilizers: is the arachidonic acid cascade a common target? *Molecular Psychiatry*, 13, 585-596.
- RAO S, M.-C. M., YAO Y, GUO Z, XU Q, LI SUIYAN, ET AL 2017. Peripheral blood nerve growth factor levels in major psychiatric disorders. *J Psychiatr Res.*, 86, 39-45.
- RAPOPORT S I 2014. Lithium and the other mood stabilizers effective in bipolar disorder target the rat brain arachidonic acid cascade. *ACS Chem. Neurosci*, 5, 459-467.
- REMLINGER-MOLENDA A, WÓJCIAK P, MICHALAK M & RYBAKOWSKI J 2012. Activity of selected cytokines in bipolar patients during manic and depressive episodes. *Psychiatr Pol*, 46, 599-611.
- RICO-BAUTISTA E, FLORES-MORALES A & FERNANDEZ-PEREZ L 2006. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17, 431-439.
- ROLSTAD S, JAKOBSSON J, SELLGREN C, ISGREN A, EKMAN CJ, BJERKE M & ET AL 2015. CSF neuroinflammatory biomarkers in bipolar disorder are associated with cognitive impairment. *Eur Neuropsychopharmacol*, 25, 1091-1098.
- SCHLOESSER RJ, H. J., KLEIN PS, MANJI HK, 2008. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*, 33, 110-133.
- SCHROETER ML, A.-K. H., SACHER J, STEINER J, BLASIG IE, MUELLER K, 2010. Mood disorders are glial disorders: evidence from in vivo studies. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, doi: 10.1155/2010/780645.
- SCHÜLE C, Z. P., BAGHAI TC, ESER D, ZWANZGER P, WENIG N, ET AL 2006. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and dexamethasone/CRH test results in depressed patients. *Psychoneuroendocrinology*, 31.
- SERRETTI A & MANDELLI L 2008. The genetics of bipolar disorder: genome 'hot regions,' genes, new potential candidates and future directions. *Mol Psychiatry* 13.

- SHALDUBINA A, EINAT H, SZECHTMAN H, SHIMON H & BELMAKER RH 2002. Preliminary evaluation of oral anticonvulsant treatment in the quinpirole model of bipolar disorder. *Journal of Neural Transmission* 109, 433-440.
- SHI J, WITTKKE-THOMPSON JK, BADNER JA, HATTORI E, POTASH JB, WILLOUR VL & AL, E. 2008. Clock genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B.
- SHI S, YANG W, TU X, WANG C, CHEN C & CHEN Y 2013. 5-Lipoxygenase Inhibitor Zileuton Inhibits Neuronal Apoptosis Following Focal Cerebral Ischemia. *Inflammation*, 36, 1209-1217.
- SHORTER E 2009. The history of lithium therapy. *Bipolar Disord*, 11, 4-9.
- SILVA BC, MIRANDA AS, RODRIGUES F, SILVEIRA AL, RESENDE GH, MORAES MF & AL, E. 2015. The 5-lipoxygenase (5-LOX) Inhibitor Zileuton Reduces Inflammation and Infarct Size with Improvement in Neurological Outcome Following Cerebral Ischemia. *Current Neurovascular Research*, 12, 398-403.
- SÖDERLUND J, OLSSON SK, SAMUELSSON MARTIN, WALTHER-JALLOWL & JOHANSSON C 2011. Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-1 β in bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*, 36, 114–118.
- SORCE S & KRAUSE KH 2009. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal* 11, 2481-2504.
- SPOOREN A, K. K., LAUREYS G, CLINCKERS R, DE KEYSER J, HAEGEMAN G, GERLO S 2011. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res Rev* 67, 157–183.
- STRAKOWSKI SM, ADLER CM, ALMEIDA J, ALTSHULER LL, BLUMBERG HP, CHANG KD & ET AL. 2012. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar Disord* 14, 313–325.
- TEIXEIRA A L, B. I. G., DINIZ B S, KUMMER A, 2010. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function. *Biomark Med*, 4, 871-887.
- TEIXEIRA AL, BARBOSA IG, MACHADO-VIEIRA R, RIZZO LB, WIECK A & BAUER ME 2013. Novel biomarkers for bipolar disorder. *Expert Opin Med Diagn*, 7, 147-59.
- TONIN PT, VALVASSORI SS, LOPES-BORGES J, MARIOT E, VARELA RB, TEIXEIRA AL & QUEVEDO J 2014. Effects of ouabain on cytokine/chemokine levels in an animal model of mania. *J Neuroimmunol*, 276, 236-239.
- TORKAMANI A, T. E., SCHORK NJ, 2008. Pathway analysis of seven common diseases assessed by genome-wide association. *Genomics*, 92, 265–272.
- TSYBKO A S, I. T. V., POPOVA N K, 2017. Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in the pathogenesis and treatment of mood disorders. *Rev. Neurosci*, advance online publication, DOI 10.1515/revneuro-2016-0063.
- VALVASSORI SS, B. J., VARELA RB, QUEVEDO J, 2013. Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Rev Bras Psiquiatr.*, 35, 121-131.
- VALVASSORI SS, T. P., VARELA RB, CARVALHO AF, MARIOT E, AMBONI RT, ET AL 2015. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disord* 17, 507–517.
- VINCZE I, P. N., BURESI C, BAUD P, BELLIVIER F, ETAIN B, ET AL, 2008. Association between brain-derived neurotrophic factor gene and a severe form of bipolar disorder, but no interaction with the serotonin transporter gene. *Bipolar Disord*, 10, 580-587.
- WATSON S, G. P., RITCHIE JC, FERRIER IN, YOUNG AH, 2004. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*, 184.
- WINGENFELD K, W. O. 2015 Effects of cortisol on cognition in major depressive disorder, posttraumatic stress disorder and borderline personality disorder - 2014 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 282-295.

- YORK JM, B. N., BAYNARD T, FREUND GG, 2012. Mouse testing methods in psychoneuroimmunology: an overview of how to measure sickness, depressive/anxietal, cognitive, and physical activity behaviors. *Methods Mol Biol* 934, 243–276.
- YOUNG J, G. A., MINASSIAN A, PERRY W, PAULUS M, GEYER M, 2010. GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: mimicking quantitative assessment of manic behavior. *Psychopharmacology*, 443-454.
- YOUNG JW, HENRY BL & GEYER MA 2011. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. *British Journal of Pharmacology*, 164, 1263– 1284.