

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO LÍTILO EM PARÂMETROS
INFLAMATÓRIOS E NEUROTRÓFICOS EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR
DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA**

GIOVANA BRISTOT

Orientadora

Prof^a Dr^a Márcia Kauer-Sant'Anna

Porto Alegre, fevereiro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO LÍTILO EM PARÂMETROS
INFLAMATÓRIOS E NEUOTRÓFICOS EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR
DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA**

GIOVANA BRISTOT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, fevereiro de 2017.

CIP - Catalogação na Publicação

Bristot, Giovana

Efeitos do lítio em parâmetros inflamatórios e neurotróficos em um modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina. / Giovana Bristot. -- 2017.
133 f.

Orientadora: Márcia Kauer-Sant'Anna.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Transtorno bipolar. 2. Modelo animal de mania. 3. Lítio. 4. Inflamação. 5. Dimesilato de lisdexanfetamina. I. Kauer-Sant'Anna, Márcia, orient. II. Título.

... Ao meu avô Izalino (*in
memoriam*).

*“Sólo cabe progresar cuando se piensa en grande,
sólo es posible avanzar cuando se mira lejos.”*

(José Ortega y Gasset)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Márcia Kauer-Sant'Anna, pela orientação, pelos ensinamentos e pelo incentivo durante esta importante etapa da minha formação acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Psiquiatria Molecular: Bi Aguiar, Bi Pfaffenseller, Bruna Maria, Ellen, Rafa, Thaís, Lu, Duda, André, Lari e Érica, com quem é muito bom trocar ideias e compartilhar momentos. Em especial, agradeço à Bruna Maria, à Ellen e à Lu, cuja ajuda foi essencial para a realização da parte experimental deste trabalho; e à Bi Pfaffenseller pela amizade, discussões sempre muito produtivas e constante disposição em ajudar. Muito obrigada pelo companheirismo, pelas trocas de ideias e pelos momentos de descontração.

Aos demais colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular, pela troca de saberes e pelos momentos alegres.

Ao Leo Meira, pelas dicas e discussões sobre imuno, pela ajuda com as imagens de microscopia e pelo convívio.

Às amigas Su e Fabi, pelo convívio diário, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

À minha família, por ser meu suporte, pelo apoio constante, pela compreensão nos momentos em que estive ausente e por sempre me incentivar a realizar meus sonhos. Muito obrigada por tudo! Amo vocês!

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| PARTE I | 1 |
| RESUMO | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 4 |
| LISTA DE FIGURAS | 6 |
| 1. INTRODUÇÃO | 7 |
| 1.1 Transtorno Bipolar (TB) | 7 |
| 1.2 Tratamento do TB | 8 |
| 1.2.1 O uso do lítio no TB..... | 10 |
| 1.2.1.1 Mecanismo de ação do Lítio | 12 |
| 1.3 Fisiopatologia do TB..... | 14 |
| 1.3.1 Neurotrofinas | 14 |
| 1.3.2 Inflamação..... | 16 |
| 1.4 Células Gliais e TB | 18 |
| 1.4.1 Ativação Microglial no TB | 19 |
| 1.5 Modelo Animal de Mania | 21 |
| 1.6 Justificativa | 24 |
| 2. OBJETIVOS..... | 26 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 26 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 26 |
| PARTE II | 27 |
| 3. RESULTADOS | 28 |
| 3.1 Capítulo I..... | 29 |
| <i>The effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in an animal model of mania.</i> | 29 |
| 3.2 Capítulo II | 64 |
| <i>Padronização da técnica de imuno-histoquímica para a identificação de astrócitos e microglia em encéfalo de ratos</i> | 64 |
| PARTE III | 79 |
| 4. DISCUSSÃO | 80 |
| 5. CONCLUSÕES | 88 |
| 6. PERSPECTIVAS | 90 |

| | |
|--|-----|
| REFERÊNCIAS | 91 |
| ANEXO A | 110 |
| <i>Carta de aprovação do projeto sob número 150538 pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA).</i> | 110 |
| ANEXO B..... | 112 |
| <i>Instruções para a submissão de manuscritos na revista Journal of Psychiatric Research.</i> | 112 |

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado está organizada em três partes, conforme a seguir:

Parte I: Resumo, *Abstract*, Introdução e Objetivos;

Parte II: Capítulo I, com os resultados apresentados na forma de artigo científico; e Capítulo II, com a descrição da padronização da técnica de imunohistoquímica utilizada neste trabalho.

Parte III: Discussão, Conclusões e Perspectivas.

Além disso, na sequência constam as Referências e na seção de Anexos encontram-se: a) Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA); b) Instruções para a submissão de manuscritos na revista *Journal of Psychiatric Research*.

PARTE I

RESUMO

O transtorno bipolar (TB) tem sido associado a elevados índices de comorbidades médicas. Múltiplas vias biológicas aparentam estar envolvidas na conexão entre o transtorno bipolar e estas comorbidades, sendo que a inflamação vem ganhando destaque. Evidências sugerem que o lítio, o tratamento padrão ouro para esta doença, possui propriedades anti-inflamatórias. No entanto, até o momento, não consta na literatura um estudo investigando os efeitos do lítio em fatores inflamatórios e neurotróficos em resposta a um estímulo inflamatório em um modelo animal de mania. Desta forma, este estudo visou avaliar se um modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina (LDX) exibe um perfil inflamatório e analisar o efeito de uma ativação imune causada por lipopolissacarídeo (LPS) neste modelo. Adicionalmente, avaliamos a ação do lítio em fatores inflamatórios e neurotróficos. Ratos Wistar adultos machos foram submetidos ao modelo animal de mania e, após ser realizado o teste de comportamento, receberam LPS para causar uma ativação imune sistêmica. Posteriormente, foi coletado sangue dos animais para medir os níveis séricos de marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 e iNOS) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). LDX induziu hiperatividade nos animais e causou um aumento nos níveis de BDNF, porém não influenciou nos níveis de nenhum marcador inflamatório. O lítio não afetou os níveis de BDNF sérico, mas foi eficaz em prevenir o aumento nos níveis de iNOS nos ratos submetidos à ativação imune. Os resultados obtidos até o momento não permitem concluir acerca dos efeitos anti-inflamatórios do lítio neste modelo animal de mania, uma vez que o LDX não induziu inflamação. No entanto, o lítio possivelmente apresenta propriedade anti-inflamatória, visto que evitou o aumento de iNOS sérico em resposta à administração de LPS. A fim de investigar posteriormente os potenciais efeitos anti-inflamatórios do lítio também em nível central, foi realizada a padronização da técnica de imuno-histoquímica para a identificação de astrócitos e microglia, bem como para a classificação das células microgliais em fenótipo M1 (proinflamatório) ou M2 (anti-inflamatório). Para isso, foram utilizados os seguintes marcadores: GFAP para astrócitos; Iba1 para microglia; iNOS para o fenótipo M1; e arginase para o fenótipo M2. As condições apropriadas da técnica foram estabelecidas e, como perspectiva deste trabalho, a técnica padronizada será aplicada na avaliação destes tipos celulares neste modelo animal de mania.

ABSTRACT

Bipolar disorder has been associated with high rates of medical comorbidities. Multiple biological pathways appear to be involved in the connection between bipolar disorder and these comorbidities, and inflammation is gathering further importance. Evidences suggest that lithium, the gold standard treatment for this illness, has anti-inflammatory properties. However, no study investigated the effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in an animal model of mania. This study was designed to evaluate whether an animal model of mania induced by lisdexanfetamine dimesilate (LDX) exhibits an inflammatory profile and analyze the effect of a further immune activation caused by lipopolysaccharides (LPS) in this model. Moreover, we evaluated the action of lithium on inflammatory and neurotrophic factors. Adult male Wistar rats were submitted to the animal model of mania and after the open-field test were administered LPS to cause systemic immune activation. Subsequently, animals had their blood collected and serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and inflammatory markers (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 and iNOS) were measured. LDX induced hyperactivity in the animals, but did not increase any inflammatory marker, except BDNF levels. Lithium had no effect in BDNF serum levels, but prevented the increase in the iNOS levels in animals submitted to immune activation. Based on these results, we cannot conclude about lithium anti-inflammatory effects on this particular animal model of mania. Nonetheless, lithium prevented augmentation in the iNOS serum levels caused by LPS. In order to investigate potential anti-inflammatory effects of lithium in the SNC, standardization of the immunohistochemistry technique was performed to identify astrocytes and microglia, as well as classifying microglial cells in M1 (pro-inflammatory) or M2 (anti-inflammatory) phenotype. For this purpose, the following markers were used: GFAP for astrocytes; Iba1 for microglia; iNOS for M1 phenotype; and arginase for M2 phenotype. Appropriate experimental technic parameters were established and, as a perspective to current findings would be the assessment of these cells centrally in this animal model of mania

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| AMPC | Adenosina monofosfato cíclico (do inglês, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>) |
| AMPH | D-anfetamina (do inglês, <i>D-amphetamine</i>) |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, <i>brain derived neurotrophic factor</i>) |
| CBP | Proteína ligadora de CREB (do inglês, <i>CREB binding protein</i>) |
| CREB | Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (do inglês, <i>cAMP response element binding protein</i>) |
| ERK/MAPK | Cinase regulada por sinal extracelular/cinase ativada por mitógeno (do inglês, <i>extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase</i>) |
| GFAP | Proteína ácida fibrilar glial (do inglês, <i>glial fibrillary acidic protein</i>) |
| GSK3 | Glicogênio sintase cinase (do inglês, <i>glycogen synthase kinase</i>) |
| HPA | Hipotálamo-pituitária-adrenal |
| Iba1 | <i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> |
| IGF | Fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês, <i>insulin-like growth factor</i>) |
| IL | Interleucina |
| IMPase | Inositol monofosfatase (do inglês, <i>inositol monophosphatase</i>) |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i>) |
| IP ₃ | 1,4,5-inositol trifosfato (do inglês, <i>inositol 1,4,5-triphosphate</i>) |
| LDX | Dimesilato de lisdexanfetamina (do inglês, <i>lisdexamphetamine dimesilate</i>) |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| NF-κB | Fator nuclear κB (do inglês, <i>nuclear factor κB</i>) |
| NGF | Fator de crescimento neural (do inglês, <i>nerve growth factor</i>) |
| NO [•] | Óxido nítrico |
| PI3K | Fosfatidil-inositol 3-cinase (do inglês, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>) |
| PKB/Akt | Proteína cinase B (do inglês, <i>protein kinase B</i>) |
| SNC | Sistema nervoso central |

| | |
|---------------|---|
| TB | Transtorno bipolar |
| TBARS | Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (do inglês, <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>) |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i>) |
| Trk | Receptor tirosina cinase (do inglês, <i>tyrosine receptor kinase</i>) |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de transdução de sinal responsivas ao lítio, com foco na sinalização PI/PKC e GSK-3 13

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno Bipolar (TB)

O transtorno bipolar (TB) é uma doença psiquiátrica crônica caracterizada por oscilações de humor entre episódios de mania ou hipomania e depressão. Nos últimos anos tem sido observado um aumento na prevalência do TB em nível mundial, sendo que hoje estima-se que 1-4 % da população é afetada pelo transtorno (Saunders & Geddes, 2016).

O TB classifica-se em TB tipo I, TB tipo II e espectro bipolar, segundo o manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5) (APA, 2014). O primeiro é caracterizado por um curso clínico no qual há a presença de um ou mais episódios maníacos ou episódios mistos, intercalados frequentemente com um ou mais episódios depressivos. Por outro lado, o TB tipo II possui como característica marcante a ocorrência de episódios depressivos maiores e episódios hipomaniacos (Shim *et al.*, 2014).

O episódio maníaco consiste em um estado de humor persistentemente elevado, expansivo ou irritável e aumento da energia ou da atividade dirigida a objetivos, com duração mínima de uma semana ou se houver necessidade de hospitalização (APA, 2014). Em geral, o indivíduo em episódio maníaco apresenta sintomas como desorganização e impulsividade comportamentais, energia em alta, agitação psicomotora, redução significativa da necessidade de sono, autoestima inflada ou grandiosidade, fuga de ideias e envolvimento excessivo em atividades com elevado potencial para consequências dolorosas (APA, 2014). A hipomania, por sua vez, consiste em um estado de euforia com sintomas semelhantes à mania, porém com alterações mais moderadas e duração mínima de quatro dias, geralmente não

envolvendo um estado severo a ponto de causar prejuízos funcionais acentuados no âmbito familiar, social e ocupacional ou haver necessidade de internação (APA, 2014, Belmaker, 2004).

Em contrapartida, durante episódios depressivos, o indivíduo encontra-se melancólico e pessimista, além de poder exibir comportamentos e pensamentos lentificados, sensação de fadiga, queixas de ordem somática, desinteresse por atividades as quais habitualmente lhe dariam prazer, aumento ou redução do sono, baixa autoestima e ideação suicida (Belmaker, 2004, Suppes & Dennehy, 2009). Entre a ocorrência dos episódios maníacos ou hipomaníacos e depressivos o indivíduo com TB passa por períodos de eutímia, caracterizados por serem períodos em que o paciente apresenta remissão dos sintomas e permanece com o humor estável (Souza, 2005).

O prognóstico de pacientes com TB está diretamente relacionado com a duração da doença assim como com o número de episódios. Pacientes com múltiplos episódios e longa duração da doença, por exemplo, tendem a ser mais graves que aqueles com poucos episódios, e isto parece comprometer o dia-a-dia destes indivíduos no que diz respeito ao desempenho social e ocupacional (Souza, 2005).

1.2 Tratamento do TB

O tratamento do TB é baseado no manejo dos episódios agudos e no tratamento de manutenção como meio de prevenção para diminuir a ocorrência de novos episódios de humor, o que frequentemente é alcançado com o uso de estabilizadores de humor. Lítio, valproato de sódio, lamotrigina, olanzapina, quetiapina e aripiprazol são os fármacos comumente utilizados para o tratamento de manutenção do TB, sendo que os dois primeiros são os estabilizadores de humor mais utilizados na prática clínica (Yatham *et al.*, 2013).

Para ser considerado um estabilizador de humor, o composto deve apresentar eficácia na mania e em estados mistos, ser capaz de tratar a depressão aguda bipolar, diminuir a frequência e/ou gravidade de episódios de mania e/ou depressão e não piorar a mania ou a depressão nem induzir ciclagem rápida (presença de ao menos quatro episódios distintos de mania, depressão, hipomania ou misto no período de um ano) (Bowden *et al.*, 1997; Moreno & Moreno, 2005).

O lítio foi o primeiro fármaco a ser utilizado como estabilizador de humor para o tratamento do TB e permanece até hoje como o medicamento mais eficaz na fase de manutenção, apesar de outros compostos apresentarem eficácia nesta fase, tais como valproato, carbamazepina e lamotrigina (Souza, 2005). Além dos estabilizadores de humor, os antipsicóticos atípicos - tais como clozapina, olanzapina e risperidona - são comumente utilizados no tratamento do TB; assim como antidepressivos (apenas em tratamento combinado com estabilizadores), sendo que os de primeira escolha são os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e a bupropiona (Sachs *et al.*, 2000).

A monoterapia nem sempre é possível no TB e a combinação de fármacos é frequentemente usada no TB, uma vez que múltiplos mecanismos de ação proporcionam um melhor controle do quadro clínico (Souza, 2005). Além do mais, uma combinação de drogas pode permitir doses menores e serem mais bem toleradas; por outro lado, podem resultar em um efeito colateral aditivo. Algumas combinações utilizadas são: lítio e antipsicótico (Small *et al.*, 1995), lítio e carbamazepina (Small *et al.*, 1995), lítio e fluoxetina (Tondo *et al.*, 1997), lítio e lamotrigina (Calabrese *et al.*, 1996), valproato e carbamazepina (Schaff *et al.*, 1993).

1.2.1 O uso do lítio no TB

O lítio é um elemento químico, de símbolo Li, encontrado principalmente em rochas magmáticas da crosta terrestre. O composto utilizado de forma terapêutica predominante na psiquiatria é o carbonato de lítio (Li_2CO_3) (Zung *et al.*, 2010).

O lítio começou a ser utilizado com finalidade terapêutica em 1840 na forma de carbonato. Nessa época, foi usado para o tratamento de doenças associadas ao excesso de ácido úrico no organismo, como a gota, pois havia sido observado em estudos *in vitro* que o carbonato de lítio era capaz de dissolver os cristais de ácido úrico (Mitchell & Hadzi-Pavlovic, 2000). A partir de tal observação, o lítio passou a ser indicado para o tratamento de uma série de doenças e como promotor de saúde (Zung *et al.*, 2010). No entanto, o amplo uso deste composto resultou em casos de toxicidade, o que fez com que o mesmo permanecesse então negligenciado até a década de 40, quando John Frederick Joseph Cade testou o efeito de sais de lítio em *guinea pigs* e observou que estes compostos eram capazes de controlar a excitabilidade nestes animais (Cade, 2000).

Posteriormente, Cade conduziu o primeiro estudo clínico a fim de avaliar o efeito do lítio no controle agudo da mania, tendo encontrado um efeito positivo nos 10 pacientes maníacos nos quais testou o composto (Cade, 2000). Na sequência, outros estudos replicaram os achados de Cade, como o de Schou e colaboradores em 1954, o qual foi um dos primeiros estudos duplo-cego com lítio a mostrar resultados positivos no controle da mania aguda (Schou *et al.*, 1954). No entanto, foi em 1967, num estudo de Bastrup e Schou, que o efeito profilático da litioterapia ficou evidente (Bastrup & Schou, 1967). Os pesquisadores observaram 88 pacientes ao longo de 6,5 anos, que haviam sofrido pelo menos dois episódios maníacos num período de dois anos, e constataram que o número de episódios decaiu em média 87 % comparado à evolução

prévia ao lítio (Baastrup & Schou, 1967). Estudos subsequentes comprovaram o efeito benéfico do lítio (Coppen *et al.*, 1971; Prien *et al.*, 1973), sendo que em 1971 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso terapêutico do lítio em fases de mania, e em 1974 a litioterapia foi aprovada pela mesma como profilaxia no TB (Zung *et al.*, 2010).

Nessas cinco décadas de uso na psiquiatria, o lítio se tornou o medicamento mais eficaz no tratamento do TB. A eficácia do composto na fase de mania pode atingir 70 a 80 %, com uma latência de resposta de cerca de duas a quatro semanas (Zung *et al.*, 2010). A dose de lítio necessária para manter um nível sérico terapêutico varia de 0,5 a 1,2 mmol/L e depende de fatores como idade, peso, condições clínicas associadas e outras medicações em uso. A dosagem sérica (litemia) deve ser realizada periodicamente pelos pacientes para a realização de possíveis ajustes de dose, pois uma litemia baixa pode não atingir o nível terapêutico, assim como uma litemia elevada tem potencial tóxico para o organismo. Desta forma, a litemia ideal para o tratamento de quadros de mania aguda, estados mistos e ciclagem rápida é de aproximadamente 0,8 mmol/L (Zung *et al.*, 2010).

Entretanto, os benefícios da litioterapia são frequentemente acompanhados por efeitos colaterais, os quais muitas vezes tendem a desaparecer com o tempo, tais como: aumento de peso (Torrent *et al.*, 2008); distúrbios gastrointestinais; alterações das funções tireoideana, renal e cardiovascular; polidipsia e poliúria; sonolência (Freeman & Freeman, 2006); fadiga, lentificação motora e fraqueza muscular; tonturas e tremores (Ghadirian & Lehmann, 1980; Van Gerpen, 2002). Quando a litemia está acima de 1,5 mmol/L, o paciente frequentemente apresenta sinais clínicos de intoxicação, os quais são caracterizados pela exacerbação dos efeitos colaterais. O risco de intoxicação eleva-se em casos de desidratação, com o uso de medicações que alteram o nível sérico de

lítio e quando o paciente toma maior quantidade de lítio que a prescrita (Freeman & Freeman, 2006).

1.2.1.1 Mecanismo de ação do Lítio

Apesar de o lítio ser utilizado em psiquiatria há décadas para o tratamento de TB, assim como de outros transtornos psiquiátricos como depressão e esquizofrenia, até o momento seu mecanismo de ação não está completamente esclarecido. No entanto, certas moléculas e vias biológicas receberam uma atenção especial ao longo dos anos como potenciais alvos de ação desta medicação. Sabe-se que o lítio inibe as enzimas inositol monofosfatase (IMPase) e adenilil ciclase, resultando respectivamente na redução dos níveis de inositol livre/inositol trifosfato (IP₃) e adenosina monofosfato cíclica (AMPC), o que leva a uma diminuição na sinalização intracelular (Malhi *et al.*, 2013). Além disso, a enzima glicogênio sintase cinase (GSK3) – que possui duas isoformas, α e β , com alto grau de homologia entre suas funções e conhecidas conjuntamente como GSK3 - é indubitavelmente alvo das ações do lítio, sendo inibida por esse composto direta e indiretamente (Can *et al.*, 2014) (**Figura 1**).

A GSK3 está envolvida na modulação de importantes vias de sinalização intracelular, como a via da proteína cinase B (PKB/Akt), responsável pela regulação da sobrevivência celular; e a via de sinalização Wnt, a qual está envolvida em uma série de processos celulares, incluindo apoptose e proliferação celular (Can *et al.*, 2014). Esta enzima também possui um papel importante na resposta inflamatória, visto que sua ação é essencial para que ocorra estimulação de certas citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL)-1 β , IL-6 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), e diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 (Beurel, 2011). Desta forma, considerando que o lítio inibe GSK3, este composto pode estar atuando na redução da inflamação. Além disso,

uma boa resposta clínica ao lítio foi positivamente correlacionada com a normalização da atividade do sistema imune (van den Ameele *et al.*, 2016).

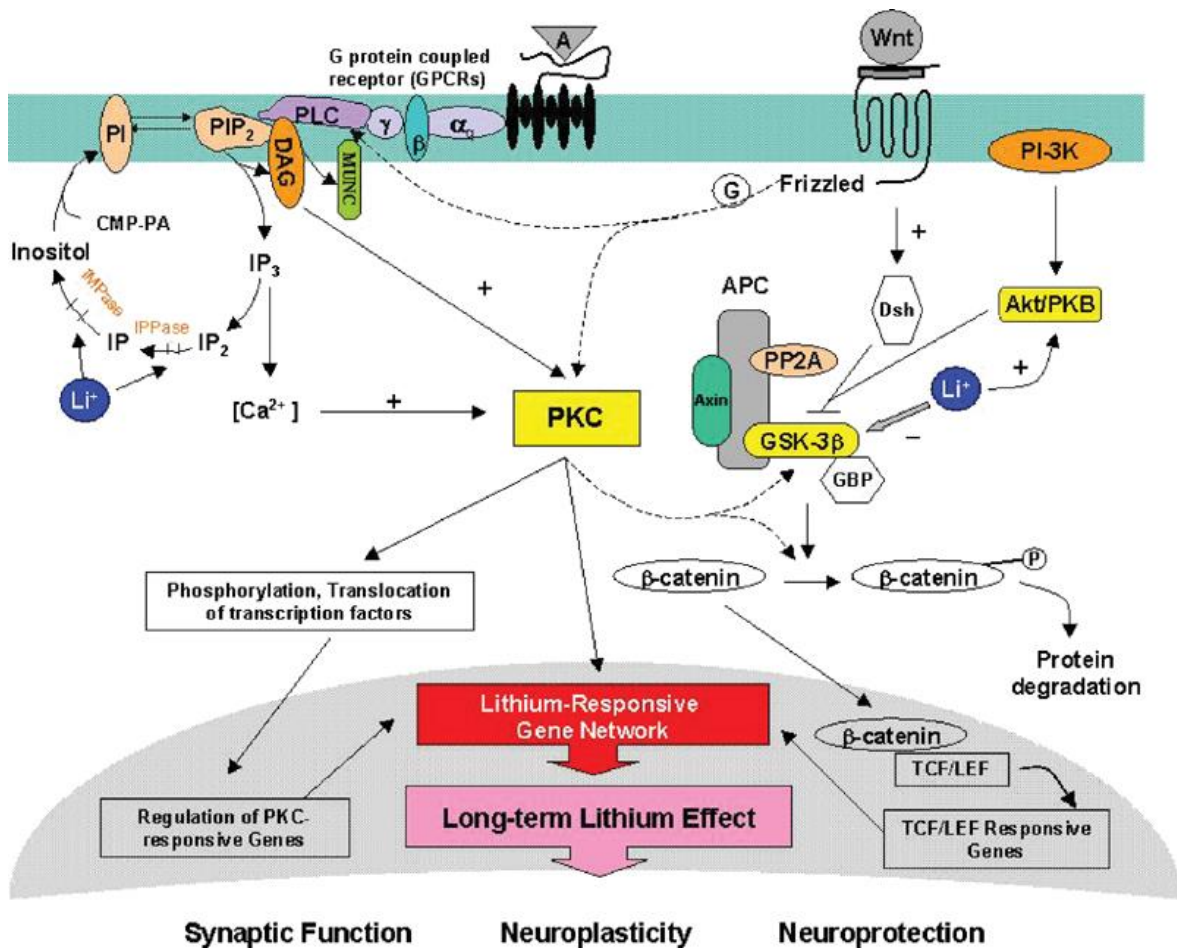


Figura 1: Vias de transdução de sinal respondivas ao lítio, com foco na sinalização PI/PKC e GSK-3. O lítio inibe diretamente a enzima inositol monofosfatase (IMPase). A união dos ligantes a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) ativa PLC e causa a hidrólise de PIP₂ a IP₃ e DAG. IP₃ estimula a liberação do Ca²⁺ intracelular, e o DAG ativa a proteína cinase C (PKC) dependente de DAG. Na presença dos ligantes do receptor (A), a inibição a longo prazo da IMPase resulta em uma depleção do mioinositol (myo-I) e em um acúmulo de DAG, seguido por uma *downregulation* da PKC. Por outro lado, o lítio é um potente inibidor da glicogênio sintase cinase -3 (GSK-3), levando a uma estabilização da β-catenina, a qual entra no núcleo para ativar genes LEF/TCF-dependentes. A hipótese é de que as redes de genes respondivos ao lítio são ativadas através das vias de sinalização PKC e GSK-3. Siglas: Akt/PKB, serina/treonina cinase; DAG, diacilglicerol; Dsh, *dishevelled*; G, proteína G; GBP, proteína ligadora de GSK-3; GSK-3, glicogênio sintase cinase 3; IP₃, 1,4,5-inositol trifosfato; LEF/TCF, família de fatores de transcrição *lymphoid enhancer element/T cell factor-1*; PI, fosfatidilinositol; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato; PP2A, proteína fosfatase 2A; PLC, fosfolipase C; Wnt, glicoproteína ligante para a via de sinalização Wnt/β-catenina. Adaptado de Lenox & Wang, 2003 (Lenox & Wang, 2003).

Tunca e colaboradores sugeriram que o lítio exerce seu efeito terapêutico em parte por estimular a produção e a liberação de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Tunca *et al.*, 2014). Adicionalmente, o lítio possui efeitos antioxidantes na prevenção da progressão do TB, pois este composto foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS), o que também esteve associado à eficácia clínica desta medicação (de Sousa *et al.*, 2014). Sendo assim, o lítio apresenta, entre outras, propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetora, o que pode explicar em parte sua eficiência no tratamento do TB.

1.3 Fisiopatologia do TB

O TB é um transtorno multifatorial complexo; desta forma, tanto fatores genéticos quanto ambientais e hábitos relacionados ao estilo de vida, assim como eventos estressores ou traumáticos, podem ser determinantes para o início da doença ou para a reincidência de episódios de humor (Naaldijk *et al.*, 2016). Embora a fisiopatologia desta doença não esteja completamente elucidada, grandes avanços visando o esclarecimento da mesma têm sido relatados. Dentre os diversos estudos realizados nos últimos anos referentes a este tema, percebe-se que achados significativos concentram-se primariamente nas vias biológicas relacionadas a neurotrofinas e inflamação, as quais estão ligadas à neuroplasticidade.

1.3.1 Neurotrofinas

As neurotrofinas são proteínas encontradas no sistema nervoso central (SNC) e que são importantes para o crescimento, diferenciação e sobrevivência das células nervosas. A família das neurotrofinas é composta pelo BDNF, pelo fator de crescimento neural

(NGF) e pelas neurotrofinas 3, 4, 5 e 6, entre outros (Soeiro-de-Souza *et al.*, 2012). Esses fatores podem ser secretados tanto de forma constitutiva quanto transitória, e exercem seus efeitos através da ligação e ativação de receptores tirosina-cinase (Trk) específicos, modulando desta forma vias intracelulares distintas (Shaltiel *et al.*, 2007).

O BDNF é a neurotrofina mais abundante no tecido nervoso e encontra-se amplamente distribuída no SNC, tendo a capacidade de induzir efeitos neurotróficos e neuroprotetores de longo prazo (Murer *et al.*, 2001). Sua importância já foi descrita em diversos processos neuronais relacionados ao desenvolvimento neuronal, neurogênese, sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, arborização dendrítica e memória de longa duração (Post, 2007). Os efeitos biológicos exercidos pelo BDNF ocorrem devido à ativação de vias de sinalização intracelular distintas, destacando-se a via da fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B ou Akt (PI3K/PKB ou Akt), fosfolipase C (PLC) e cinase regulada por sinal extracelular/cinase ativada por mitógeno (ERK/MAPK).

Estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado uma importante associação entre BDNF e transtornos psiquiátricos, entre eles o TB, evidenciando uma redução nos níveis séricos desta neurotrofina em indivíduos com diagnóstico de TB durante episódios maníacos e depressivos, quando comparados a pacientes eutímicos e controles saudáveis (Cunha *et al.*, 2006; de Oliveira *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Kauer-Sant'Anna e colaboradores, ao serem comparados pacientes bipolares que tinham apresentado somente um episódio de humor com pacientes que haviam tido múltiplos episódios foi observado que os níveis de BDNF diminuem com o número de episódios (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2009). Além disso, os níveis de BDNF também apresentaram uma correlação negativa com a duração da doença (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2009). Desta forma, uma vez consolidada esta relação entre TB e BDNF, atribui-se a esta

neurotrofina uma contribuição essencial no que diz respeito ao entendimento da fisiopatologia do TB, assim como de outras doenças mentais.

1.3.2 Inflamação

A participação do sistema imune na fisiopatologia do TB tem conquistado um espaço significativo nos últimos anos. Isso se deve à crescente confirmação de que alterações imunológicas, representadas principalmente pelos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias circulantes em pacientes bipolares, estariam relacionadas à progressão da doença e a elevados índices de comorbidades médicas, tais como doenças autoimunes, diabetes, disfunção metabólica, doenças cardiovasculares e doença pulmonar obstrutiva crônica (Forty *et al.*, 2014; Rosenblat & McIntyre, 2016), assim como à severidade e à recorrência de episódios de humor (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2009).

As citocinas são pequenas moléculas classicamente responsáveis por orquestrar a resposta imune (Medzhitov, 2008). Além desta função clássica, estas proteínas podem afetar diretamente a atividade neuronal de modo a induzir excitabilidade neuronal e alterações na neuroplasticidade (Dantzer *et al.*, 2008). Adicionalmente, as citocinas têm potencial para influenciar na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) - o qual exerce um papel fundamental na resposta a estímulos internos e externos, inclusive a estressores psicológicos - assim como podem afetar a função do receptor de glicocorticoides (Montgomery & Bowers, 2012). Desta maneira, estas proteínas têm a capacidade de ativar o eixo HPA, elevando os níveis do hormônio liberador de corticotropina, do hormônio adrenocorticotrófico e do cortisol; e diminuindo a expressão dos receptores de glicocorticoides. Isso resulta num aumento persistente dos

níveis de glicocorticoides, os quais têm sido associados com episódios de humor (Barbosa *et al.*, 2014)

A presença de um estado proinflamatório tem sido relatada durante episódios de humor, nos quais se observou um aumento nos níveis periféricos de citocinas proinflamatórias – IL-6 e TNF- α no decorrer de episódios depressivos; e IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α durante episódios de mania – quando comparados a pacientes em eutímia e controles saudáveis (Brietzke *et al.*, 2009; Ortiz-Domínguez *et al.*, 2007).

Leboyer e colaboradores demonstraram que um grau de inflamação está presente em pacientes com TB e esquizofrenia, tendo em vista que foram encontradas alterações nos níveis de citocinas e proteínas de fase aguda tanto em nível central quanto periférico, o que poderia estar refletindo um dano presente no SNC (Leboyer *et al.*, 2016). A origem destas alterações em marcadores inflamatórios podem ser o resultado de uma interação entre diferentes fatores, destacando-se elementos imunogenéticos, experiências traumáticas e infecções (Leboyer *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2015).

No entanto, observando os dados presentes na literatura, muitas vezes nota-se a presença de resultados contraditórios. Modabbernia e colaboradores, por exemplo, através de uma meta-análise na qual foram incluídos 30 estudos, concluíram que ocorre uma ativação de citocinas proinflamatórias, anti-inflamatórias e regulatórias no TB (Modabbernia *et al.*, 2013). Outro estudo desta classe, por sua vez, destacou a presença de um perfil inflamatório e ativação de células T em pacientes com TB, depressão e esquizofrenia, tanto na fase aguda como na fase crônica, visto que foram encontradas alterações nos níveis sanguíneos de citocinas nestes indivíduos (Goldsmith *et al.*, 2016).

1.4 Células Gliais e TB

O SNC é constituído basicamente por neurónios e pelas células gliais (neuroglia). A neuroglia pode ser classificada em dois grupos que se distinguem morfológica e funcionalmente: a macroglia e a microglia. A macroglia compreende a oligodendroglia, a ependimoglia e a astroglia, que inclui os astrócitos que são a principal fonte de fatores de crescimento para os neurónios. A microglia, por outro lado, possui como principal função a defesa imune do SNC e geralmente é recrutada após lesões, infecções ou doenças neurodegenerativas do sistema nervoso (Gomes *et al.*, 2013).

As células gliais são constituintes essenciais do sistema nervoso, e possuem funções importantes na manutenção da homeostase (astrócitos), mielinização (oligodendrócitos) e promoção de um ambiente cerebral adequado (microglia). Os astrócitos atuam na manutenção dos níveis iónicos do meio extracelular, além de outras atuações funcionais, dentre as quais se destacam: sua capacidade proliferativa formando cicatriz glial ao redor de lesões (gliose), produção e liberação de fatores tróficos que contribuem para a sobrevivência de neurónios, participação na formação da barreira hematoencefálica e na reposição de íons e moléculas envolvidos na transmissão sináptica (Gomes *et al.*, 2013). As células da microglia, por sua vez, são consideradas os “macrófagos cerebrais”, uma vez que são responsáveis principalmente pela fagocitose de micro-organismos invasores e pela retirada de restos celulares.

Pesquisas voltadas ao estudo de alterações astrogliais que possivelmente estejam implicadas na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos vêm sendo realizadas utilizando dados referentes à proteína ácida fibrilar glial (GFAP), considerada um marcador clássico das células astrocíticas, assim como de astrogliose reativa (Bondan *et al.*, 2003). Feresten e colaboradores, por exemplo, observaram um aumento na expressão gênica de GFAP em pacientes com esquizofrenia e com TB quando

comparados a controles saudáveis e indivíduos com sintomas psicóticos em relação àqueles que não apresentavam sintomas desta natureza (Feresten *et al.*, 2013).

Além disso, também se tem buscado compreender uma possível relação entre microglia e neuroinflamação. Neste sentido, um estudo conduzido por Weitz e Town revelou que células microgliais ativadas secretam as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , as quais têm potencial para causar dano tanto aos neurônios quanto às células gliais (Weitz & Town, 2012). Alguns estudos *post-mortem* envolvendo pacientes psiquiátricos têm demonstrado alterações na concentração de marcadores de astrócitos e microglia, sugerindo um possível papel da neuroinflamação nestas patologias (Rao *et al.*, 2010).

1.4.1 Ativação Microglial no TB

As células microgliais são ativadas quando ocorre um insulto ao SNC e liberam moléculas inflamatórias, tais como citocinas e quimiocinas como resposta. Esta ativação é um processo fisiológico que atua como um mecanismo de proteção. No entanto, se este insulto permanece ao longo do tempo, poderá causar dano ao cérebro e morte celular (Gomes *et al.*, 2013).

A microglia apresenta certo grau de plasticidade e pode polarizar para pelo menos três diferentes fenótipos: M0, M1 e M2. Sabe-se que a microglia não está a todo o momento em estado de repouso, motivo pelo qual a denominação M0 é considerada mais adequada do que “microglia de repouso”. Este fenótipo M0 é dito protetor atenuado, uma vez que realiza a vigilância do microambiente cerebral e libera BDNF e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fatores neurotróficos importantes para a função cerebral (Franco & Fernandez-Suarez, 2015). Quando M0 é ativado, especialmente por lipopolissacarídeo (LPS), interferon- γ (IFN- γ) e TNF- α , o mesmo

polariza para um fenótipo pró-inflamatório denominado M1. Por outro lado, um estado anti-inflamatório – ou fenótipo M2 – pode ser induzido por IL-4 e IL-13 (M2a); LPS ou complexos imunes (M2b); IL-10 e fator de necrose tumoral β (TNF- β) (M2c) (Cherry, *et al.*, 2014,; Nakagawa & Chiba, 2015). No entanto, pesquisadores com expertise em estudos envolvendo ativação e polarização de macrófagos se reuniram no Congresso Internacional de Imunologia em 2013, em Milão, e propuseram que uma nova nomenclatura seja adotada, a fim de descrever de forma mais clara a ativação de macrófagos e alcançar padrões experimentais (Murray *et al.*, 2014). Desta forma, sugerem que ao invés da denominação M1 ou M2 seja descrito o cenário de estimulação dos macrófagos e adotada uma nomenclatura ligada a estes padrões de ativação, isto é, M(LPS), M(IL-4), M(IFN- γ), M(IL-10) (Murray *et al.*, 2014).

Um estudo *post mortem* conduzido por Rao *et al.* sugeriu que os pacientes com TB apresentam um aumento na ativação microglial quando comparados a controles, uma vez que foi observado um aumento nos níveis de mRNA de CD11b (marcador expresso pela microglia ativada) no córtex pré-frontal de pacientes bipolares (Rao *et al.*, 2010). Além disso, um recente estudo de imagem revelou aumento na neuroinflamação e na atividade microglial no hipocampo de pacientes bipolares (Haarman *et al.*, 2014). Baseado nestas evidências tem-se sugerido que a ativação do sistema imune no TB pode estar associada com a neuroinflamação através de uma ativação microglial excessiva.

Estudos demonstraram que o lítio inibe a atividade de GSK3 β em células microgliais, e dessa forma evita que estas células liberem citocinas inflamatórias, como TNF- α , por exemplo, evidenciando que esta medicação pode regular a resposta inflamatória (Wang *et al.*, 2010; Yuskaitis & Jope, 2009). Além disso, outro estudo mostrou que o lítio inibe a polarização da microglia induzida por LPS para o fenótipo

M1, o que pode evitar que citocinas pró-inflamatórias sejam liberadas no tecido cerebral (Kalkman & Feuerbach, 2016).

1.5 Modelo Animal de Mania

Os modelos animais representam uma ferramenta pré-clínica fundamental no que diz respeito ao estudo da fisiopatologia de diversas doenças, assim como no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de um grande número de patologias. A utilização de modelos animais para o estudo de doenças psiquiátricas, no entanto, possui algumas limitações, uma vez que se pretende replicar aspectos característicos do comportamento, da cognição e da funcionalidade de humanos em uma espécie animal distinta (Machado-Vieira *et al.*, 2004).

Três critérios têm sido recomendados para que um modelo animal seja validado como tal: validade aparente, validade preditiva e validade de constructo (interpretativa). No caso de um modelo animal para o TB, como um modelo animal de mania, a validade aparente é baseada nas semelhanças entre os sintomas maníacos observados em humanos e o comportamento dos animais submetidos ao modelo em questão; já a validade interpretativa é alcançada quando o modelo animal reproduz as bases biológicas e os fatores desencadeadores da patologia em humanos (os aspectos fisiopatológicos poderiam explicar as alterações encontradas no modelo animal e no transtorno que está sendo estudado); e a validade preditiva, por outro lado, avalia o quanto as alterações comportamentais induzidas no modelo são prevenidas ou revertidas pelos fármacos usados no tratamento do transtorno (Frey *et al.*, 2006a; Machado-Vieira *et al.*, 2004).

Alguns modelos animais de TB têm sido propostos, porém o transtorno apresenta algumas características complexas, destacando-se a recorrência e a ciclicidade da

doença (Kapczinski *et al.*, 2009), as quais são difíceis de serem mimetizadas em animais e representam uma limitação neste tipo de estudo pré-clínico. Sendo assim, os modelos animais para TB tendem a focar em apenas uma das fases do transtorno, procurando mimetizar o episódio depressivo ou o episódio maníaco da doença, uma vez que até o momento não foi possível induzir alterações de humor cíclicas em animais de maneira similar às apresentadas pelos pacientes. Neste sentido, há drogas que apresentam a capacidade de induzir sintomas semelhantes aos da mania, como por exemplo, alterações no sono, hiperlocomoção, hiperatividade, aumento do impulso sexual, entre outros (Davies *et al.*, 1974; Fiorino & Phillips, 1999). Entre elas, a D-anfetamina (D-AMPH), um estimulante dopaminérgico, tem sido empregada no desenvolvimento de modelos animais de mania (Einat, 2006; Frey *et al.*, 2006a; Frey *et al.*, 2006b; Frey *et al.*, 2006c). A dopamina é um neurotransmissor catecolamínico altamente presente no SNC e exerce um papel essencial na regulação do humor e das funções cognitivas, sendo que alterações na transmissão dopaminérgica têm sido observadas no TB (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Klanker *et al.*, 2013).

O modelo animal de D-AMPH foi inicialmente proposto por Frey e colaboradores (Frey *et al.*, 2006a), e consistia em administrar, por via intraperitoneal, D-AMPH em ratos Wistar seguido de uma avaliação da sua atividade locomotora pelo teste do campo aberto. Além de causar mudanças comportamentais, este modelo mostrou que a D-AMPH provoca alterações neuroquímicas, particularmente em marcadores de estresse oxidativo e neurotrofinas. Tais alterações corroboraram com os resultados de estudos clínicos em pacientes bipolares. Por fim, os autores trataram estes animais com os dois principais estabilizadores de humor usados na prática clínica (lítio e valproato) e avaliaram a atividade locomotora. Ambos os agentes farmacológicos foram capazes de prevenir e de reverter a hiperlocomoção induzida pela D-AMPH (Frey

et al., 2006a; Frey *et al.*, 2006d). Com isto, os autores demonstraram a validade aparente, de construto e preditiva do referido modelo.

Adicionalmente, a anfetamina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer efeito agonista dopaminérgico e noradrenérgico através da inibição da recaptação destes neurotransmissores, conduzindo a uma hiperativação de vias como a mesolímbica e a nigro-estriatal (Fleckenstein *et al.*, 2007). No entanto, devido ao fato de D-AMPH apresentar alto potencial para abuso (Kolar *et al.*, 2008), sua aquisição tem se tornado altamente controlada por órgãos regulatórios em vários países, limitando o seu uso em pesquisa.

Desta forma, tem-se buscado por outras substâncias similares para induzir o modelo animal de mania, como por exemplo, o dimesilato de lisdexanfetamina (LDX) (Vyvanse®), o qual é um fármaco utilizado para o tratamento de déficit de atenção e hiperatividade. A LDX, ao passar pelo trato gastrointestinal, sofre biotransformação, sendo convertida na sua forma ativa, a D-AMPH, através da enzima tripsina (Rowley *et al.*, 2012). Recentemente, um grupo de pesquisadores mostrou que 10 mg/kg de LDX é capaz de induzir modificações comportamentais (hiperlocomoção) e neuroquímicas (estresse oxidativo) em ratos, as quais se assemelham às alterações observadas em modelos animais de mania usando D-AMPH (Macêdo *et al.*, 2013). Além disso, neste estudo foi observado que as alterações neuroquímicas, ou seja, o desbalanço oxidativo determinado por redução nos níveis de glutatona reduzida e aumento nos níveis de peroxidação lipídica em áreas cerebrais (estriado, hipocampo e córtex pré-frontal) são prevenidas e revertidas pelo estabilizador de humor lítio; estes dados sugerem que a hiperlocomoção induzida por LDX pode ter validade preditiva como um modelo animal de mania.

1.6 Justificativa

A fisiopatologia do TB ainda não está esclarecida, tratando-se de uma doença multifatorial. Entre estes fatores, há evidências de que as vias biológicas relacionadas à inflamação e a fatores neurotróficos que parecem estar associados a alterações neurocognitivas, as quais parecem agravar-se de acordo com a progressão do TB. Da mesma forma, o lítio, um tratamento de primeira escolha eficaz para todas as fases da doença- ou seja: mania, depressão e manutenção - não tem seu mecanismo de ação plenamente esclarecido. A literatura sugere, entre outros mecanismos, que ação anti-inflamatória pode fazer parte dos efeitos importantes do lítio na sua função como estabilizador do humor. No entanto, isto ainda não foi avaliado em um modelo animal de mania posteriormente submetido a uma ativação imune sistêmica.

Desta maneira, tendo em vista que a inflamação está presente em pacientes bipolares - os quais apresentam geralmente uma boa resposta ao lítio - e que o mecanismo pelo qual este fármaco atua como estabilizador ainda não está completamente esclarecido, visamos investigar a ação do lítio sobre parâmetros inflamatórios em um modelo animal de mania. Além disso, considerando que as neurotrofinas atuam na manutenção da estrutura e função cerebral e que uma ativação imune causa redução de fatores neurotróficos, pretendemos estudar a interação entre BDNF e mediadores inflamatórios (citocinas e óxido nítrico sintase induzível iNOS) após um estímulo inflamatório nos animais previamente submetidos ao modelo animal de mania, assim como a ação do lítio sobre BDNF, citocinas e iNOS.

Adicionalmente, além dos efeitos periféricos da doença e de seus tratamentos, é importante conhecer os seus efeitos sobre o sistema imune central. Assim, considerando-se que as células gliais podem estar envolvidas nas alterações neurocognitivas presentes no TB e que o lítio frequentemente conduz a uma melhora

neste quadro, é justificado o estudo de disfunções gliais em estruturas cerebrais do modelo animal de mania e a influência do lítio sobre estas disfunções. Tendo em vista que a inflamação está sendo associada aos transtornos psiquiátricos e a microglia exerce função imune no SNC, torna-se válido estudar a ativação microglial e marcadores inflamatórios periféricos concomitantemente, a fim de analisar se neuroinflamação e inflamação periférica estão associadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros inflamatórios e neurotróficos em um modelo animal de mania induzido por LDX e submetido à ativação imune por LPS e analisar o efeito do lítio.

2.2 Objetivos Específicos

- Observar e caracterizar o comportamento locomotor apresentado por roedores após a administração de LDX. Em seguida, avaliar os efeitos da administração de lítio sobre a atividade locomotora dos animais;
- Avaliar os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α no soro desses animais em resposta à administração de LDX e ao desafio com LPS, assim como o efeito do lítio sobre estes marcadores;
- Avaliar os níveis séricos de iNOS em resposta à administração de LDX e ao desafio com LPS, bem como o efeito do lítio sobre este parâmetro;
- Quantificar os níveis proteicos de BDNF no soro dos animais após a administração de LDX e a ativação imune com LPS, assim como o efeito do lítio sobre este fator neurotrófico.
- Padronizar a técnica de imuno-histoquímica para posterior identificação de células microgliais e astrócitos utilizando o marcador microglial Iba1 e o marcador de astrócitos GFAP.
- Padronizar os anticorpos anti-iNOS e anti-arginase para possibilitar a posterior classificação de microglia ativada nos fenótipos M1 (iNOS/proinflamatória) e M2 (arginase/anti-inflamatória).

PARTE II

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em dois capítulos: no capítulo I consta o artigo científico a ser submetido para publicação na revista *Journal of Psychiatric Research* e no capítulo II encontram-se os dados referentes à padronização da técnica de imuno-histoquímica para avaliação de marcadores de microglia e de astrócitos no modelo animal de mania utilizado neste trabalho.

3.1 Capítulo I

The effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in an animal model of mania.

Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Psychiatric Research*

Title: The effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in an animal model of mania.

Category: Original article

Authors:

Giovana Bristot^{a,b}

giubristot@gmail.com; Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil

Bruna Maria Ascoli^{a,c}

bruna.ascoli@gmail.com; Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil

Ellen Scotton^a

ellenc7@hotmail.com; Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil

Luiza Paul Géa^{a,d}

lu.p.gea@gmail.com; Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil

Bianca Pfaffenseller^a

bianca.pfaffenseller@gmail.com; Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil

Márcia Kauer-Sant'Anna^{a,b,c}

mksantanna@gmail.com; Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil

Authors' affiliation:

^a Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Postgraduate Program in Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-903, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Postgraduate Program in Psychiatry and Behavioral Science, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Postgraduate Program in Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author:

Márcia Kauer-Sant'Anna, PhD

Laboratório de Psiquiatria Molecular – Centro de Pesquisa Experimental

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 – Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: + 55 51 3359-8021

E-mail: mksantanna@gmail.com

Word count of the abstract: 237

Word count of the article body: 3876

Number of references: 60

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Abstract

Bipolar disorder has been associated with high rates of medical comorbidities. Multiple biological pathways appear to be involved in the connection between bipolar disorder and these comorbidities, and inflammation is gathering further importance. Evidences suggest that lithium, the gold standard treatment for this illness, has anti-inflammatory properties. However, no study investigated the effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in an animal model of mania. This study was designed to evaluate whether an animal model of mania induced by lisdexanfetamine dimesilate (LDX) exhibits an inflammatory profile and analyze the effect of a further immune activation caused by lipopolysaccharides (LPS) in this model. Moreover, we evaluated the action of lithium on inflammatory and neurotrophic factors. Adult male Wistar rats were submitted to the animal model of mania and after the open-field test were administered LPS to cause systemic immune activation. Subsequently, animals had their blood collected and serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and inflammatory markers (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 and iNOS) were measured. LDX induced hyperactivity in the animals, but did not increase any inflammatory marker, except BDNF levels. Lithium had no effect in BDNF serum levels, but prevented the increase in the iNOS levels in animals submitted to immune activation. Based on these results, we cannot conclude about lithium anti-inflammatory effects on this particular animal model of mania. Nonetheless, lithium prevented augmentation in the iNOS serum levels caused by LPS.

Key words: bipolar disorder, mania, lithium, inflammation, lisdexanfetamine dimesilate, brain derived neurotrophic factor

1. Introduction

Bipolar disorder is a severe psychiatry disorder, which affects 1-4% of the population (Saunders and Geddes, 2016). In addition, bipolar disorder is associated with high rates of medical comorbidities (Forty et al., 2014), such as autoimmune disorders, cardiovascular disease and metabolic dysfunction (Crump et al., 2013; Rosenblat and McIntyre, 2016). The connection between bipolar disorder and these comorbidities seems to involve multiple biological pathways, of which inflammation stands out as a pivotal pathophysiological mechanism.

Recently, Leboyer and colleagues suggested that a low-grade inflammation is present in bipolar patients, based on alterations in peripheral and central inflammatory markers, which may be associated with a damage in the central nervous system (CNS) (Leboyer et al., 2016). A meta-analysis of 30 studies have shown that there is an activation of pro-inflammatory, anti-inflammatory and regulatory cytokines in bipolar disorder, however to date it is unknown their precise role on pathophysiology of this mental disorder (Modabbernia et al., 2013).

Lithium, the gold standard treatment for bipolar disorder, was implicated in the immune system modulation since the pioneer work of Horrobin and Lieb (Horrobin and Lieb, 1981). From then, investigations about the effect of lithium on inflammation were performed and a study have shown a decreased number of cytokine-secreting cells (IL-6, IL-10, IL-2 and IFN- γ) in bipolar patients after chronic lithium treatment, suggesting that lithium may normalize immune activation (Boufidou et al., 2004).

In addition to its effects on inflammation, lithium acts in other biological pathways related to oxidative stress and neurotrophins (Goldstein et al., 2009), probably helping to retard illness progression. Neurotrophins are essential for the development and maintenance of the CNS; among them, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is

widely distributed in the brain and is associated with synaptic transmission and plasticity (Shaltiel et al., 2007). BDNF serum levels are decreased in bipolar patients during mood episodes compared to euthymic patients and controls (Cunha et al., 2006; Fernandes et al., 2015; Tunca et al., 2014). Lithium, among other therapeutic actions, possibly up-regulates BDNF contributing to achieve euthymia (Tunca et al., 2014).

Based on the fact that increased dopaminergic transmission was observed in manic episodes, dopaminergic drugs have been used in order to mimic the manic phase of bipolar disorder and enable preclinical studies related to this illness (Berk et al., 2007). Initially, Frey *et al.* proposed the animal model of mania induced by amphetamine (Frey et al., 2006) and more recently lisdexamfetamine dimesylate (LDX), a prodrug approved for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder, has been used for the same purpose (Macêdo et al., 2013). Although manic episodes are not as simple as an increase in dopaminergic transmission, these models are useful to investigate new antimanic medications (de Souza et al., 2015; Mavrikaki et al., 2010) or to understand how classical mood stabilizers such as lithium exert their effects.

There are evidences that immune activation plays a role in the pathophysiology of bipolar disorder and that lithium may present potential anti-inflammatory properties. Therefore, in this study we aimed to investigate 1) if the animal model of mania induced by LDX exhibits an inflammatory profile; 2) if a systemic immune activation by LPS administration enhance the presumed inflammatory profile caused by LDX; 3) and if lithium is able to control this inflammatory response. Furthermore, we evaluated BDNF levels in order to study if there is interplay between inflammatory mediators and this neurotrophic factor in this animal model.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Lisdexamfetamine dimesilate (LDX; Vyvanse®, Shire, USA), lithium chloride (LiCl; 213233; Sigma-Aldrich, USA) and lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4 (LPS; L2630; Sigma-Aldrich, USA) were used. All reagents were freshly prepared just before their use.

2.2. Animals

Sixty-day-old male Wistar rats (weighing 250 – 350 g) obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, were used. The animals were housed four per cage, in standard polycarbonate rat cages and standard environmental conditions: 12 hours in a light/dark cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.) in air-conditioned constant temperature (22 ± 1 °C) and food and water available *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#150538) and were carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - Eighth Edition (NIH, 2011). All efforts were made in order to minimize the number of animals used and their suffering.

2.3. Treatments

The animals received one daily administration of LDX 10 mg/kg in order to induce hyperactivity (a manic episode feature) or saline by gavage during 14 days (32 rats per group). On the 8th day of treatment, the animals in the LDX (LDX+) and saline (LDX-) groups were assigned into two subgroups (16 rats in each one) and additionally received intraperitoneal administration of lithium 47.5 mg/kg or saline twice a day, in order to reproduce the management of an acute manic episode as previously proposed as a

reversal model of mania (Frey et al., 2006; Macêdo et al., 2013). On the 14th day, locomotor activity was measured 2 hours after the last oral administration (LDX or saline). After that, half of the animals of each subgroup (8 rats) were allocated to receive one single intraperitoneal administration of LPS (5 mg/kg) to induce immune activation and the other half (8 rats) did not receive the endotoxin. The animals which did not receive LPS were submitted to deep anesthesia, had their blood collected and underwent intracardiac perfusion shortly after the assessment of the locomotor activity in the 14th day. Those which received LPS were anesthetized (cetamine 80-100 mg/Kg : xylazine 5-10 mg/Kg) and had their blood withdrawn from the tail vein 6 hours later the LPS injection on the 14th day; these animals underwent intracardiac perfusion on the 15th day (*Figure 1*). The blood collected from each animal was allowed to clot and serum was separated by centrifugation (1000 x g/10 min). Serum samples were stored at -80 °C until assayed.

2.4. Locomotor activity: Open-field test

The locomotor activity was assessed 2 hours after the last oral administration (LDX or saline) using the open-field test. The test was performed in a round field open on top and limited by 50 cm high acrylic walls from the sides and with a diameter of 80 cm. The floor of the arena was divided into segments and the internal space of the arena was empty. The animals were gently placed at the center of the apparatus without a habituation period in order to explore the arena for 5 minutes and an activity monitor was used to record the behavior of each animal. Subsequently, the videos were analyzed using ANY-maze behavioral tracking software and data referring to number of crossings (to determine horizontal activity) and number of rearings (to determine vertical activity) were obtained.

2.5. Quantification of BDNF protein levels

BDNF serum levels were measured by sandwich-ELISA using a commercial kit, according to the manufacturer's instructions (Millipore, USA). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were incubated overnight at 4 °C with the samples diluted 1:75 in sample diluent and standard curve ranging from 15.63 to 1000 pg/mL of BDNF. Thus, plates were washed four times with wash buffer followed by the addition of biotinylated mouse anti - BDNF monoclonal antibody (diluted 1:1000 in sample diluent), which was incubated for 3 hours at room temperature. After washing, incubation with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate solution (diluted 1:1000 in sample diluent) for 1 hour at room temperature was carried out. After the addition of substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set at 450 nm). The standard curve demonstrates a direct relation between optical density and BDNF concentration.

2.6. Quantification of cytokines levels

TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10 serum levels were measured by Milliplex Map Kit – Rat cytokine magnetic bead panel according to the manufacturer's instructions (Millipore, USA). In brief, standards or quality controls were added to appropriate wells and assay buffer was added to background and sample wells. After that, matrix solution was added to background, standards and control wells, and samples were added to the appropriated wells; beads were pipetted into the wells and the plate was incubated 2 hours at room temperature. Thus, the plate was washed two times with wash buffer followed by the addition of detection antibodies and incubated with agitation on a plate shaker overnight at 4 °C. After incubation, streptavidin conjugated to the fluorescent protein phycoerythrin was added and the plate was incubated on a plate shaker for 30 minutes at room temperature. After washing to remove the unbound streptavidin-

phycoerythrin, sheath fluid was added to all wells and the beads were resuspended on a plate shaker for 5 minutes. The beads (minimum of 50 beads per cytokine/chemokine) were analyzed in the Luminex 200™ instrument, which monitored the spectral properties of the beads while simultaneously measuring the amount of fluorescence associated with phycoerythrin. Raw data (median fluorescent intensity, MFI) were analyzed using a 5-parameter logistic method for calculating analyte concentrations in samples (Luminex Xponent software 3.1).

2.7. Quantification of iNOS levels

iNOS serum levels were measured according to the manufacturer's instructions (MyBioSource, USA) using an ELISA kit that applies the competitive enzyme immunoassay technique. In brief, the following procedure was performed: firstly, standards or samples were added to the appropriated wells and PBS (pH 7.2) was added to the blank control well of a pre-coated plate. Thus, iNOS-horseradish peroxidase (HRP) conjugate was added to each well (except the blank control well) and the plate was incubated for 1 hour at room temperature. After the incubation period, the wells were washed five times with diluted wash buffer solution. Subsequently, the substrate for HRP enzyme was pipetted and incubated for 15 minutes at room temperature. Thereafter, stop solution was added and the optical density (OD) was determined spectrophotometrically at 450 nm using a microplate reader immediately. The intensity of the color is inversely proportional to the iNOS concentration since iNOS from samples and iNOS-HRP conjugate compete for the anti-iNOS antibody binding site. A standard curve is plotted relating the intensity of the color (OD) to the concentration of standards and the iNOS concentration in each sample is interpolated from this standard curve.

2.8. Statistical analyses

GraphPad Prism 7.0 for Windows (San Diego, USA) was used to carry out all the statistical analysis. In all experiments, p values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. The results of the behavioral assessments are expressed as the means \pm Standard Errors of the Mean (SEM) of the number of crossings and rearings. Behavioral data were analyzed with one-way ANOVA, using Bonferroni test to perform post hoc comparisons. The results of biochemical measurements are expressed as means \pm SEM and were analyzed with three-way ANOVA followed by a correction for multiple testing using the two-stage step-up method of Benjamini, Krieger and Yekutieli to control the false discovery rate (Benjamini et al., 2006).

3. Results

3.1. Locomotor activity

Locomotor activity data obtained in the open-field test are presented in **Figure 2**. LDX significantly increased the number of crossings ($p < 0.001$) and showed a trend to increase the number of rearings ($p = 0.08$). The administration of lithium (Li) in the LDX treated animals reversed the hyperactive behavior by reducing the number of crossings ($p < 0.001$) and rearings ($p < 0.001$) when compared to LDX+ / Li- group.

3.2. BDNF protein levels

Serum BDNF protein levels of each group are presented in **Figure 3**. Three-way ANOVA revealed a significant effect of LDX treatment on the protein levels of BDNF ($p < 0.001$). In all groups that were administered LDX (LDX+ groups), BDNF levels are increased compared to LDX- groups, regardless the presence of lithium or LPS. In this way, these two treatments – lithium ($p = 0.676$) and LPS ($p = 0.915$) – had no significant effect on BDNF levels. Furthermore, three-way ANOVA revealed no

interaction among the analyzed factors: LDX x Li (n = 7 per group; $F(1,48) = 0.014$; $p = 0.906$); LDX x LPS (n = 7 per group; $F(1,48) = 0.134$; $p = 0.716$); Li x LPS (n = 7 per group; $F(1,48) = 0.102$; $p = 0.751$); and LDX x Li x LPS (n = 7 per group; $F(1,48) = 0.521$; $p = 0.474$).

3.3. iNOS levels

Serum iNOS levels are shown in **Figure 4**. LDX ($p = 0.781$) had no influence on iNOS, while Li ($p = 0.002$) and LPS ($p < 0.001$) presented a significant effect on iNOS levels. Interactions between two factors analyzed were not observed: LDX x Li (n = 7 per group; $F(1,48) = 1.506$; $p = 0.226$); LDX x LPS (n = 7 per group; $F(1,48) = 1.328$; $p = 0.255$); Li x LPS (n = 7 per group; $F(1,48) = 0.872$; $p = 0.355$). However, the interaction LDX x Li x LPS (n = 7 per group; $F(1,48) = 4.683$; $p = 0.036$) was significant. The post-test for multiple comparisons between groups revealed that LDX- / Li- / LPS+ group have high iNOS levels compared to LDX- / Li- / LPS- ($p < 0.001$) and compared to LDX- / Li+ / LPS+ ($p < 0.001$), indicating that LPS augmented iNOS levels and that lithium was able to prevent this increase. No differences between groups which received LDX were observed: LDX+ / Li- / LPS+ group did not differ from LDX+ / Li- / LPS- group ($p = 0.168$), suggesting that LDX helps to prevent the iNOS increase caused by LPS. Moreover, iNOS levels of LDX+ / Li- / LPS+ group are decreased compared to LDX- / Li- / LPS+ group ($p = 0.034$).

3.4. Cytokines levels

TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10 levels are shown in **Figure 5**. Three-way ANOVA revealed that neither LDX nor lithium influenced the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10. LPS, however, affected the levels of these cytokines ($p < 0.001$), as shown in **Table 1**. Interaction between the factors analyzed only is present for IL-1 β ,

where an interaction between LDX and LPS was observed ($p = 0.031$); and for IL-10, existing an interaction between lithium and LPS ($p = 0.014$).

Post-test shown that LDX- / LPS+ groups present increased levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10 compared to LDX- / LPS- groups, regardless the presence of lithium. Nonetheless, comparing LDX+ / LPS+ group to LDX+ / LPS- group, there are no differences in IL-6 ($p = 0.120$), IL-1 β ($p = 0.820$) and IL-10 ($p = 0.562$) levels in the absence of lithium, only TNF- α levels ($p = 0.037$) vary between the groups. At last, in the presence of lithium, there are a significant increase in the levels of TNF- α ($p < 0.001$), IL-6 ($p = 0.006$) and IL-10 ($p = 0.011$) in the LDX+ / LPS+ group compared to LDX+ / LPS- group, whereas the increase in the IL-1 β levels was not significant ($p = 0.248$).

4. Discussion

This study was planned to investigate potential anti-inflammatory effects of lithium and the interaction with BDNF levels in an animal model of mania with additional immune activation. Our results showed that LDX was able to induce hyperlocomotion, the main hallmark of models of mania induced by psychostimulants (Frey et al., 2006; Macêdo et al., 2013; Rezin et al., 2014) and presented a trend to increase rearing behavior, another feature found in these models. Moreover, we demonstrated that lithium reversed the hyperactivity induced by LDX, what is in accordance with Macêdo et al. (Macêdo et al., 2013). Although there are limitations in the use of animal models of mania (Machado-Vieira et al., 2004), this research approach may be used to study particular characteristics of the illness, understand specific biological pathways by which mood stabilizers act and test putative new drugs for bipolar disorder (Kalinichev and Dawson, 2011; Resende et al., 2013; Valvassori et al., 2015; Varela et al., 2015).

The presumed inflammatory profile after LDX administration was not observed in our model, as opposed to the study of Valvassori *et al.* in which amphetamine increased the levels of inflammatory cytokines (Valvassori *et al.*, 2015). Conversely, LDX prevented the increase of iNOS levels and tended to prevent the increase of inflammatory cytokines levels, especially IL-6, IL-1 β and IL-10, subsequent to an inflammatory challenge caused by LPS administration. LPS is an endotoxin that induces sickness behavior by mimicking infection by gram-negative bacteria, activating the immune system to secrete cytokines, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10 (Barsig *et al.*, 1995; Moraes *et al.*, 2017) and increasing the expression of iNOS (Saha and Pahan, 2006).

We suggest that this occurred because it is likely that LDX activates serine-threonine kinases such as cAMP-dependent protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and calmodulin kinases (CaMKs). These kinases promote phosphorylation and activation of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB), a transcriptional factor involved in many cellular processes, including cell survival, adaptative responses, synaptic plasticity and immune responses (Mayr and Montminy, 2001; Wen *et al.*, 2010). Once phosphorylated, CREB binds to the coactivator CREB binding protein (CBP), which is also able to bind nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), that is a master regulator of the transcription of several genes involved in immune and inflammatory responses (Lawrence, 2009). In this way, CREB and NF- κ B compete for limiting amounts of CBP and when CREB is activated the binding of CBP to CREB is increased and to NF- κ B is decreased, which leads to a reduction in pro-inflammatory cytokines and iNOS expression, resulting in a substantial decline in the inflammatory process (Parry and Mackman, 1997; Wen *et al.*,

2010). This hypothesis is in accordance with studies that reported that amphetamine increases CREB phosphorylation (Choe et al., 2002; Shi and McGinty, 2007)

Furthermore, LDX increased serum BDNF levels, differently of a previous study which founded reduced BDNF levels in the hippocampus of rats submitted to this same model of mania (de Souza et al., 2015). However, our result is in line with studies in animal models. Meredith *et al.* founded increased BDNF expression in rat brain structures after repeated exposure to amphetamine (Meredith et al., 2002). Moreover, methamphetamine increased the levels of BDNF in the hippocampus (McFadden et al., 2014) and dorsal striatum (Krasnova et al., 2013) in rats. Increased BDNF after a neurotoxic insult has been reported as neuroprotective in prior studies (Braun et al., 2011; Canals et al., 2001; Martinez-Serrano and Bjorklund, 1996; Perez-Navarro et al., 2000), then it is possible that in our model the augmented BDNF levels may be acting as an endogenous neuroprotective compensatory mechanism to the neurotoxic insult of LDX. The influence of LDX on BDNF levels might be occurring through CREB, since this transcription factor also has been implicated in the activation of BDNF gene expression (Tao et al., 1998).

Therefore, the increase in endogenous BDNF in response to LDX found in our study may also be modulating the immune activation caused by LPS, since the rats which were administered LDX presented lower levels of iNOS and a trend to have decreased levels of cytokines. Our hypothesis is based on a study that showed BDNF as a potential modulator of inflammation on the transcriptional and cellular levels (Jiang et al., 2010). Contrary to the expected, LPS did not affect serum BDNF protein levels in any groups. We had presumed that LPS, as an activator of NF- κ B (Karin, 1999) and stimulator of cytokines production, would reduce BDNF levels as found by Guan *et al.* and by Schnydrig *et al.* in brain structures of rats and mice, respectively (Guan and Fang, 2006;

Schnydrig et al., 2007). However, it should be considered that we measured BDNF protein levels six hours after the LPS administration and in serum, differently of the studies cited above, which analyzed BDNF expression in the SNC structures and after a longer time – 7 hours (Guan and Fang, 2006) and within 1-6 days (Schnydrig et al., 2007) subsequent to LPS. The time we chose to perform the blood collection was grounded on a study showing that six hours after LPS injection the levels of cytokines are still elevated (Biesmans et al., 2013), but LPS-induced changes in serum BDNF protein levels should appear at a longer latency.

However, as expected, LPS increased the levels of inflammatory mediators. In accordance with the literature, we found elevated TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 (Andre et al., 2008; Biesmans et al., 2013; Erickson and Banks, 2011) and iNOS levels (Jung et al., 2016) in the animals which were administered LPS. IL-1 β , IL-6, and TNF- α increase after LPS injection since are involved in the acute phase response of inflammation and IL-10 as an anti-inflammatory cytokine is upregulated to control the duration and intensity of the inflammatory response (Biesmans et al., 2013).

There are studies showing that lithium presents anti-inflammatory properties, due to its ability to reduce inflammatory markers (Albayrak et al., 2013; Kaplanski et al., 2014; Nahman et al., 2012). Nonetheless, in our study a therapeutic concentration of lithium only prevented the increase in iNOS levels, but has no effect in cytokines levels after LPS challenge. Nahman *et al.* observed that lithium reduced iNOS expression in an *in vitro* experiment and also reduced the secretion of TNF- α and IL-1 β , however they highlighted that these results were obtained only with an extra-therapeutic concentration of the drug (Nahman et al., 2012). Evidences suggest that lithium exerts its potential anti-inflammatory effects by inhibiting glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and this inhibition might reduce the activation of NF-kB, leading to a decrease in inflammatory

mediators secretion and suppression of iNOS activity (Wang et al., 2013). However, studies showed lithium has no effect on inflammatory markers such as TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 and IL-10 (Beyaert et al., 1991; Guloksuz et al., 2010; Kleinerman et al., 1989). In this way, even though evidences indicate lithium as an inhibitor of some inflammatory pathways under certain experimental conditions, it is still not possible to conclude about anti-inflammatory effects of this drug.

Moreover, lithium did not present effect on BDNF levels in our study, differently of reported in other investigations (de Souza Gomes et al., 2015; Frey et al., 2006). However, it may have occurred in our model due to the short period of time (7 days) that the animals received the drug. Fukumoto *et al.* showed that chronic (14 to 28 days) but not acute (7 days) lithium treatment increased BDNF expression in the hippocampus and frontal cortex of rats (Fukumoto et al., 2001).

In conclusion, findings of the current study suggest LDX induced hyperactivity but did not induce an inflammatory profile in rats. In this way, we cannot conclude about the possible anti-inflammatory effect of lithium in this model of mania. Lithium did not influence BDNF serum levels nor prevented the increase in cytokines after the challenge with LPS; however, lithium prevented the increase in iNOS levels caused by a systemic immune activation, indicating that it might have some anti-inflammatory property. Moreover, animals that were administered LDX showed increased BDNF in serum and it may have occurred as an endogenous neuroprotective response to the neurotoxic insult caused by LDX. Therefore, BDNF may have been essential to prevent the augmentation in the iNOS levels in response to immune activation. Further experiments are warranted to replicate this model and investigate changes in the molecular level to support the hypotheses raised by this study.

Highlights

- We mimicked mania behavior using lisdexanfetamine dymesilate.
- Lisdexanfetamine dymesilate did not induce an inflammatory profile but increased BDNF serum levels in rats.
- Lithium prevented the augmentation in the iNOS levels, but not in the cytokine levels after an immune challenge.

Role of the funding source

This study was supported by FIPE-HCPA. The funding source had no role in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report and in the decision to submit the article for publication.

Contributors

GB, BP and MK designed the study and planned the experiments. GB, BMA, ES and LPG performed animal experiments, behavioral analyses and biochemical experiments. GB, BP and MK analyzed the data and wrote the manuscript. BMA, ES and LPG critically revised the manuscript. All authors have approved the final version of this manuscript.

Conflict of interests

Giovana Bristot and Bianca Pfaffenseller were supported by scholarships from CNPq, Brazil. Bruna Maria Ascoli and Luiza Paul Géa were supported by scholarships from CAPES, Brazil. Ellen Scotton was supported by scholarship from FAPERGS, Brazil. Prof. Márcia Kauer-Sant'Anna has received research grants from CNPq-INCT-TM, CNPq Universal, CAPES, SMRI, NARSAD Young Investigator Award, Astra-Zeneca, and Lilly.

Acknowledgements

The authors thank the funding source (FIPE-HCPA) and are grateful for the support provided by CNPq, CAPES and FAPERGS.

References

- Albayrak, A., Halici, Z., Polat, B., Karakus, E., Cadirci, E., Bayir, Y., Kunak, S., Karcioğlu, S.S., Yigit, S., Unal, D., Atamanalp, S.S., 2013. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and anti-inflammatory effects in an animal model of sepsis. *Int Immunopharmacol* 16(1), 35-40.
- Andre, C., O'Connor, J.C., Kelley, K.W., Lestage, J., Dantzer, R., Castanon, N., 2008. Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol* 200(1-2), 90-99.
- Barsig, J., Kusters, S., Vogt, K., Volk, H.D., Tiegs, G., Wendel, A., 1995. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 25(10), 2888-2893.
- Benjamini, Y., Krieger, A.M., Yekutieli, D., 2006. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika* 93(3), 491-507.
- Berk, M., Dodd, S., Kauer-Sant'anna, M., Malhi, G.S., Bourin, M., Kapczinski, F., Norman, T., 2007. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl*(434), 41-49.
- Beyaert, R., Schulze-Osthoff, K., Van Roy, F., Fiers, W., 1991. Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-induced and interleukin 1-induced cytokine and cytokine receptor expression. *Cytokine* 3(4), 284-291.
- Biesmans, S., Meert, T.F., Bouwknecht, J.A., Acton, P.D., Davoodi, N., De Haes, P., Kuijlaars, J., Langlois, X., Matthews, L.J., Ver Donck, L., Hellings, N., Nuydens, R.,

2013. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm* 2013, 271359.

Boufidou, F., Nikolaou, C., Alevizos, B., Liappas, I.A., Christodoulou, G.N., 2004. Cytokine production in bipolar affective disorder patients under lithium treatment. *J Affect Disord* 82(2), 309-313.

Braun, A.A., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Hemmerle, A.M., Dickerson, J.W., Serogy, K.B., Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2011. Neurotoxic (+)-methamphetamine treatment in rats increases brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B expression in multiple brain regions. *Neuroscience* 184, 164-171.

Canals, J.M., Checa, N., Marco, S., Akerud, P., Michels, A., Perez-Navarro, E., Tolosa, E., Arenas, E., Alberch, J., 2001. Expression of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons is regulated by striatal target area. *J Neurosci* 21(1), 117-124.

Choe, E.S., Chung, K.T., Mao, L., Wang, J.Q., 2002. Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* 27(4), 565-575.

Crump, C., Sundquist, K., Winkleby, M.A., Sundquist, J., 2013. Comorbidities and mortality in bipolar disorder: a Swedish national cohort study. *JAMA Psychiatry* 70(9), 931-939.

Cunha, A.B., Frey, B.N., Andreazza, A.C., Goi, J.D., Rosa, A.R., Gonçalves, C.A., Santin, A., Kapczinski, F., 2006. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 398(3), 215-219.

de Souza, G.C., Gomes, J.A., de Gois Queiroz, A.I., de Araujo, M.M., Cavalcante, L.M., Machado Mde, J., Monte, A.S., de Lucena, D.F., Quevedo, J., Carvalho, A.F., Macedo, D., 2015. Preclinical Evidences for an Antimanic Effect of Carvedilol. *Neural Plast* 2015, 692541.

de Souza Gomes, J.A., de Souza, G.C., Berk, M., Cavalcante, L.M., de Sousa, F.C., Budni, J., de Lucena, D.F., Quevedo, J., Carvalho, A.F., Macedo, D., 2015. Antimanic-like activity of candesartan in mice: Possible involvement of antioxidant, anti-inflammatory and neurotrophic mechanisms. *Eur Neuropsychopharmacol* 25(11), 2086-2097.

Erickson, M.A., Banks, W.A., 2011. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behav Immun* 25(8), 1637-1648.

Fernandes, B.S., Molendijk, M.L., Kohler, C.A., Soares, J.C., Leite, C.M., Machado-Vieira, R., Ribeiro, T.L., Silva, J.C., Sales, P.M., Quevedo, J., Oertel-Knochel, V., Vieta, E., Gonzalez-Pinto, A., Berk, M., Carvalho, A.F., 2015. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker in bipolar disorder: a meta-analysis of 52 studies. *BMC Med* 13, 289.

Forty, L., Ulanova, A., Jones, L., Jones, I., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Farmer, A., McGuffin, P., Lewis, C.M., Hosang, G.M., Rivera, M., Craddock, N., 2014. Comorbid medical illness in bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 205(6), 465-472.

Frey, B.N., Andreazza, A.C., Ceresér, K.M., Martins, M.R., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Quevedo, J., Kapczinski, F., 2006. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* 79(3), 281-286.

Fukumoto, T., Morinobu, S., Okamoto, Y., Kagaya, A., Yamawaki, S., 2001. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 158(1), 100-106.

Goldstein, B.I., Kemp, D.E., Soczynska, J.K., McIntyre, R.S., 2009. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psychiatry* 70(8), 1078-1090.

Guan, Z., Fang, J., 2006. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav Immun* 20(1), 64-71.

Guloksuz, S., Cetin, E.A., Cetin, T., Deniz, G., Oral, E.T., Nutt, D.J., 2010. Cytokine levels in euthymic bipolar patients. *J Affect Disord* 126(3), 458-462.

Horrobin, D.F., Lieb, J., 1981. A biochemical basis for the actions of lithium on behaviour and on immunity: relapsing and remitting disorders of inflammation and immunity such as multiple sclerosis or recurrent herpes as manic-depression of the immune system. *Med Hypotheses* 7(7), 891-905.

Jiang, Y., Wei, N., Zhu, J., Lu, T., Chen, Z., Xu, G., Liu, X., 2010. Effects of brain-derived neurotrophic factor on local inflammation in experimental stroke of rat. *Mediators Inflamm* 2010, 372423.

Jung, Y.S., Park, J.H., Kim, H., Kim, S.Y., Hwang, J.Y., Hong, K.W., Bae, S.S., Choi, B.T., Lee, S.W., Shin, H.K., 2016. Probucol inhibits LPS-induced microglia activation and ameliorates brain ischemic injury in normal and hyperlipidemic mice. *Acta Pharmacol Sin* 37(8), 1031-1044.

Kalinichev, M., Dawson, L.A., 2011. Evidence for antimanic efficacy of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibitors in a strain-specific model of acute mania. *Int J Neuropsychopharmacol* 14(8), 1051-1067.

Kaplanski, J., Nassar, A., Sharon-Granit, Y., Jabareen, A., Kopal, S.L., Azab, A.N., 2014. Lithium attenuates lipopolysaccharide-induced hypothermia in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18(12), 1829-1837.

Karin, M., 1999. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18(49), 6867-6874.

Kleinerman, E.S., Knowles, R.D., Blick, M.B., Zwelling, L.A., 1989. Lithium chloride stimulates human monocytes to secrete tumor necrosis factor/cachectin. *J Leukoc Biol* 46(5), 484-492.

Krasnova, I.N., Chiflikyan, M., Justinova, Z., McCoy, M.T., Ladenheim, B., Jayanthi, S., Quintero, C., Brannock, C., Barnes, C., Adair, J.E., Lehrmann, E., Kobeissy, F.H., Gold, M.S., Becker, K.G., Goldberg, S.R., Cadet, J.L., 2013. CREB phosphorylation regulates striatal transcriptional responses in the self-administration model of methamphetamine addiction in the rat. *Neurobiol Dis* 58, 132-143.

Lawrence, T., 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6), a001651.

Leboyer, M., Oliveira, J., Tamouza, R., Groc, L., 2016. Is it time for immunopsychiatry in psychotic disorders? *Psychopharmacology (Berl)* 233(9), 1651-1660.

Machado-Vieira, R., Kapczinski, F., Soares, J.C., 2004. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(2), 209-224.

Macêdo, D.S., de Lucena, D.F., Queiroz, A.I., Cordeiro, R.C., Araújo, M.M., Sousa, F.C., Vasconcelos, S.M., Hyphantis, T.N., Quevedo, J., McIntyre, R.S., Carvalho, A.F., 2013. Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate: relevance as an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 43, 230-237.

Martinez-Serrano, A., Bjorklund, A., 1996. Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J Neurosci* 16(15), 4604-4616.

Mavrikaki, M., Nomikos, G.G., Panagis, G., 2010. Efficacy of the atypical antipsychotic aripiprazole in d-amphetamine-based preclinical models of mania. *Int J Neuropsychopharmacol* 13(4), 541-548.

Mayr, B., Montminy, M., 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8), 599-609.

McFadden, L.M., Vieira-Brock, P.L., Hanson, G.R., Fleckenstein, A.E., 2014. Methamphetamine self-administration attenuates hippocampal serotonergic deficits: role of brain-derived neurotrophic factor. *Int J Neuropsychopharmacol* 17(8), 1315-1320.

Meredith, G.E., Callen, S., Scheuer, D.A., 2002. Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res* 949(1-2), 218-227.

Modabbernia, A., Taslimi, S., Brietzke, E., Ashrafi, M., 2013. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry* 74(1), 15-25.

Moraes, M.M., Galvao, M.C., Cabral, D., Coelho, C.P., Queiroz-Hazarbassanov, N., Martins, M.F., Bondan, E.F., Bernardi, M.M., Kirsten, T.B., 2017. Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway. *PLoS One* 12(1), e0169446.

Nahman, S., Belmaker, R.H., Azab, A.N., 2012. Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells. *Innate Immun* 18(3), 447-458.

NIH, N.R.C., 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory

Animals, Eighth ed, United States.

Parry, G.C., Mackman, N., 1997. Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. *J Immunol* 159(11), 5450-5456.

Perez-Navarro, E., Canudas, A.M., Akerund, P., Alberch, J., Arenas, E., 2000. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem* 75(5), 2190-2199.

Resende, W.R., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Varela, R.B., Arent, C.O., Ribeiro, K.F., Bavaresco, D.V., Andersen, M.L., Zugno, A.I., Quevedo, J., 2013. Effects of sodium

butyrate in animal models of mania and depression: implications as a new mood stabilizer. *Behav Pharmacol* 24(7), 569-579.

Rezin, G.T., Furlanetto, C.B., Scaini, G., Valvassori, S.S., Goncalves, C.L., Ferreira, G.K., Jeremias, I.C., Resende, W.R., Cardoso, M.R., Varela, R.B., Quevedo, J., Streck, E.L., 2014. Fenproporex increases locomotor activity and alters energy metabolism, and mood stabilizers reverse these changes: a proposal for a new animal model of mania. *Mol Neurobiol* 49(2), 877-892.

Rosenblat, J.D., McIntyre, R.S., 2016. Bipolar Disorder and Inflammation. *Psychiatr Clin North Am* 39(1), 125-137.

Saha, R.N., Pahan, K., 2006. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 8(5-6), 929-947.

Saunders, K.E., Geddes, J.R., 2016. The management of bipolar disorder. *Br J Hosp Med (Lond)* 77(3), 175-179.

Schnydrig, S., Korner, L., Landweer, S., Ernst, B., Walker, G., Otten, U., Kunz, D., 2007. Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. *Neurosci Lett* 429(1), 69-73.

Shaltiel, G., Chen, G., Manji, H.K., 2007. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol* 7(1), 22-26.

Shi, X., McGinty, J.F., 2007. Repeated amphetamine treatment increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and cyclase response element-binding protein in the rat striatum. *J Neurochem* 103(2), 706-713.

Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E., 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20(4), 709-726.

Tunca, Z., Ozerdem, A., Ceylan, D., Yalcin, Y., Can, G., Resmi, H., Akan, P., Ergor, G., Aydemir, O., Cengisiz, C., Kerim, D., 2014. Alterations in BDNF (brain derived neurotrophic factor) and GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) serum levels in bipolar disorder: The role of lithium. *J Affect Disord* 166, 193-200.

Valvassori, S.S., Tonin, P.T., Varela, R.B., Carvalho, A.F., Mariot, E., Amboni, R.T., Bianchini, G., Andersen, M.L., Quevedo, J., 2015. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disord* 17(5), 507-517.

Varela, R.B., Valvassori, S.S., Lopes-Borges, J., Mariot, E., Dal-Pont, G.C., Amboni, R.T., Bianchini, G., Quevedo, J., 2015. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J Psychiatr Res* 61, 114-121.

Wang, H.M., Zhang, T., Li, Q., Huang, J.K., Chen, R.F., Sun, X.J., 2013. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by lithium chloride suppresses 6-hydroxydopamine-induced inflammatory response in primary cultured astrocytes. *Neurochem Int* 63(5), 345-353.

Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., Miller, L.S., 2010. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 185(11), 6413-6419.

Figure Legends

Figure 1. Overview of the experimental protocol. Sal = saline; Li = lithium; LDX = lisdexamfetamine dimesylate; LPS = lipopolysaccharide.

Figure 2: Open-field test. Number of crossings and rearings after seven days of treatment with LDX + seven days of LDX and lithium. Bars represent mean \pm standard error of the mean of the number of crossings or rearings. N=16 animals per group. LDX = lisdexamfetamine dimesylate; Li = lithium. **p<0.01.

Figure 3: Serum BDNF protein levels after seven days of treatment with LDX + seven days of LDX and lithium, and a single administration of LPS. Results are presented as concentration of BDNF (ng/mL). Bars represent mean \pm standard error of the mean. N = 7 animals per group. BDNF = brain-derived neurotrophic factor; LDX = lisdexamfetamine dimesylate; Li = lithium; LPS = lipopolysaccharide . **p<0.01.

Figure 4: Serum iNOS levels after seven days of treatment with LDX + seven days of LDX and lithium, and a single administration of LPS. Results are presented as concentration of iNOS (ng/mL). Bars represent mean \pm standard error of the mean. N = 7 animals per group. iNOS = inducible nitric oxide synthase; LDX = lisdexamfetamine dimesylate; Li = lithium; LPS = lipopolysaccharide . *p<0.05; **p<0.01.

Figure 5: Serum TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10 levels after seven days of treatment with LDX + seven days of LDX and lithium, and a single administration of LPS. Results are presented as concentration of cytokines (pg/mL). Bars represent mean \pm standard error of the mean. N = 7 animals per group. TNF- α = tumor necrosis factor alpha; IL-6 = interleukin 6; LDX = lisdexamfetamine dimesylate; Li = lithium; LPS = lipopolysaccharide . *p<0.05; **p<0.01.

Table 1: Analyses of the influence of LDX, Li and LPS as well the interaction between these factors in the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10.

| | TNF-α | | IL-6 | | IL-1β | | IL-10 | |
|-----------------------|--------------------------------|----------|-------------|----------|-------------------------------|----------|--------------|----------|
| | F | <i>p</i> | F | <i>p</i> | F | <i>p</i> | F | <i>p</i> |
| LDX | 0.000 | 0.997 | 0.0347 | 0.853 | 2.741 | 0.104 | 1.469 | 0.231 |
| Li | 2.138 | 0.150 | 0.698 | 0.408 | 1.008 | 0.320 | 2.532 | 0.118 |
| LPS | 46.95 | <0.001** | 26.71 | <0.001** | 14.6 | <0.001** | 27.78 | <0.001** |
| LDX x Li | 0.918 | 0.343 | 0.979 | 0.328 | 0.103 | 0.750 | 0.204 | 0.654 |
| LDX x LPS | 0.007 | 0.932 | 0.0347 | 0.853 | 4.957 | 0.031* | 4.001 | 0.051 |
| Li x LPS | 2.265 | 0.139 | 0.698 | 0.408 | 2.118 | 0.152 | 6.468 | 0.014* |
| LDX x Li x LPS | 1.082 | 0.303 | 0.979 | 0.328 | 0.006 | 0.938 | 0.034 | 0.855 |

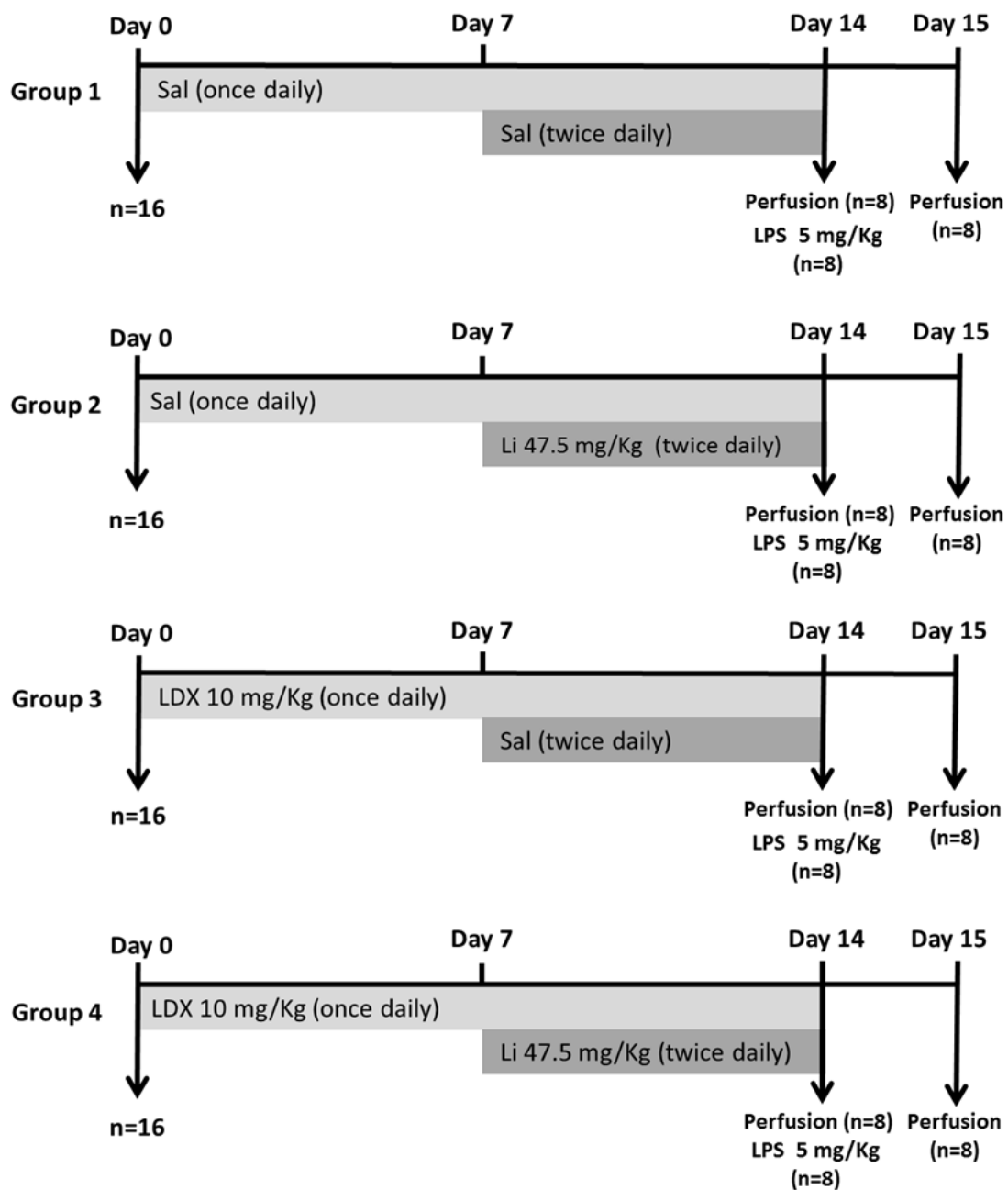


Figure 1. Overview of the experimental protocol.

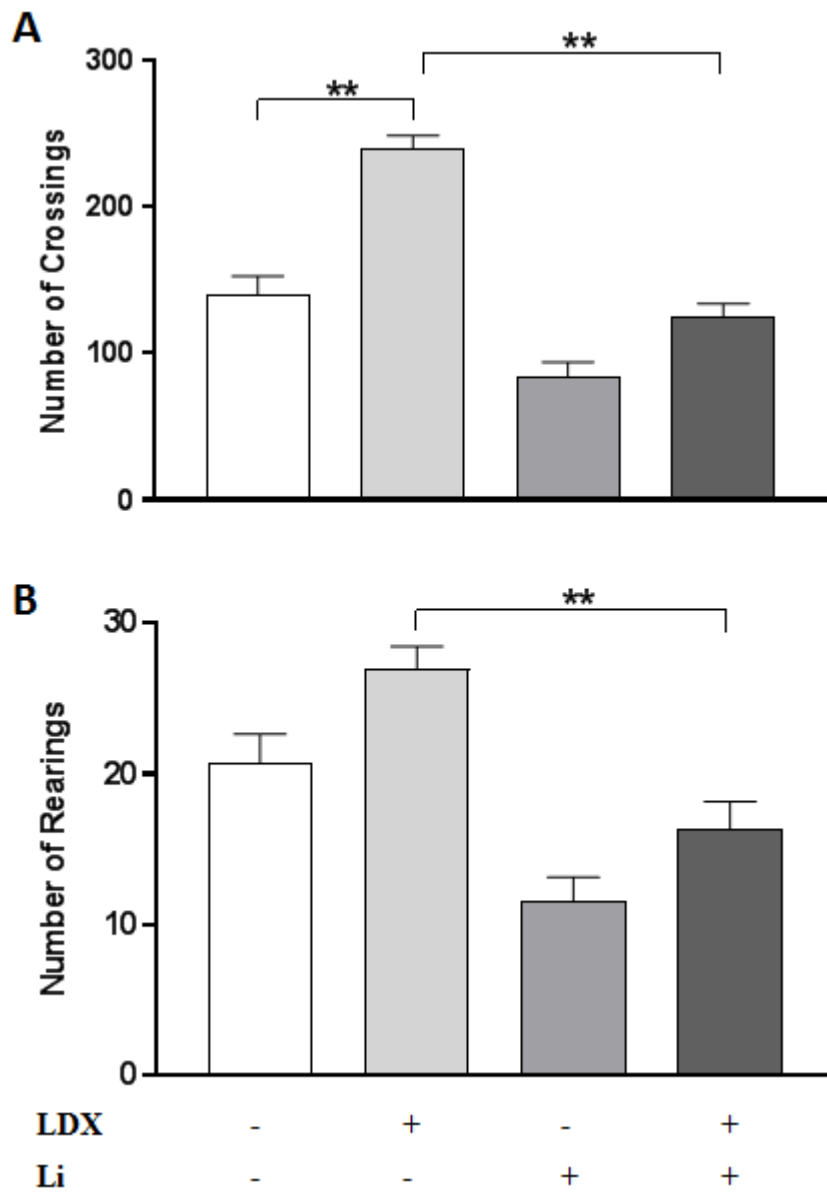


Figure 2. Open-field test.

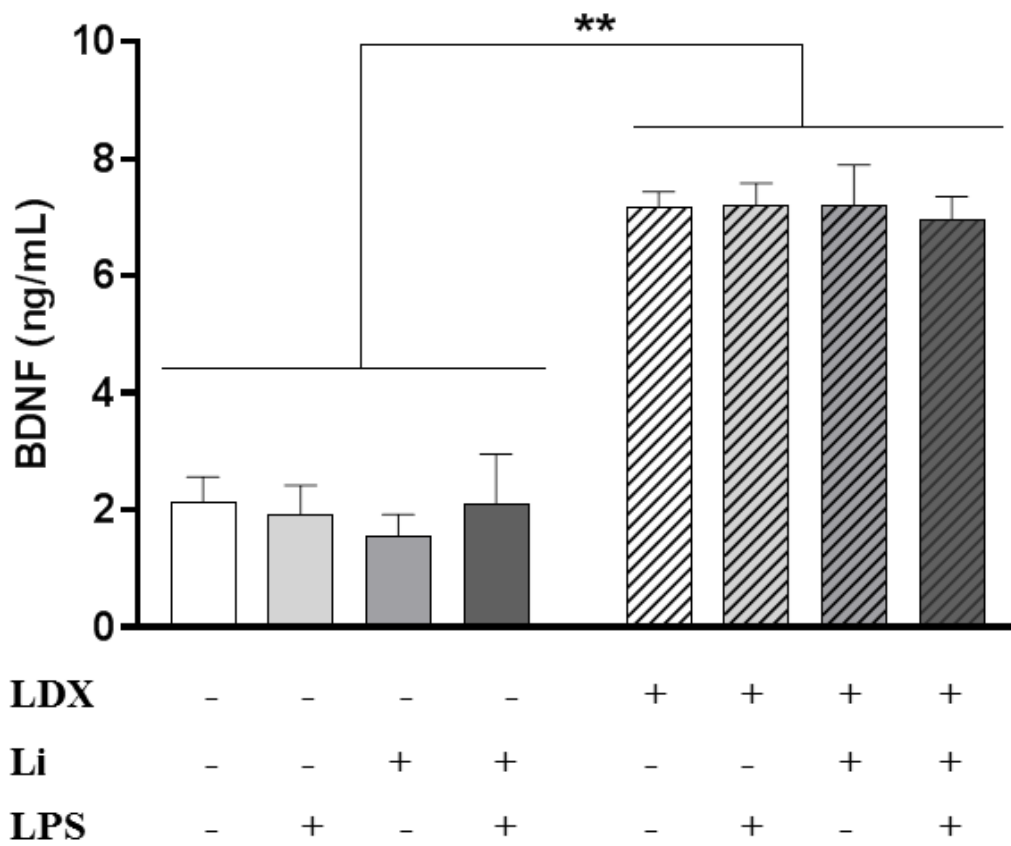


Figure 3. Serum BDNF protein levels after seven days of treatment with LDX + seven days of LDX and lithium, and a single administration of LPS.

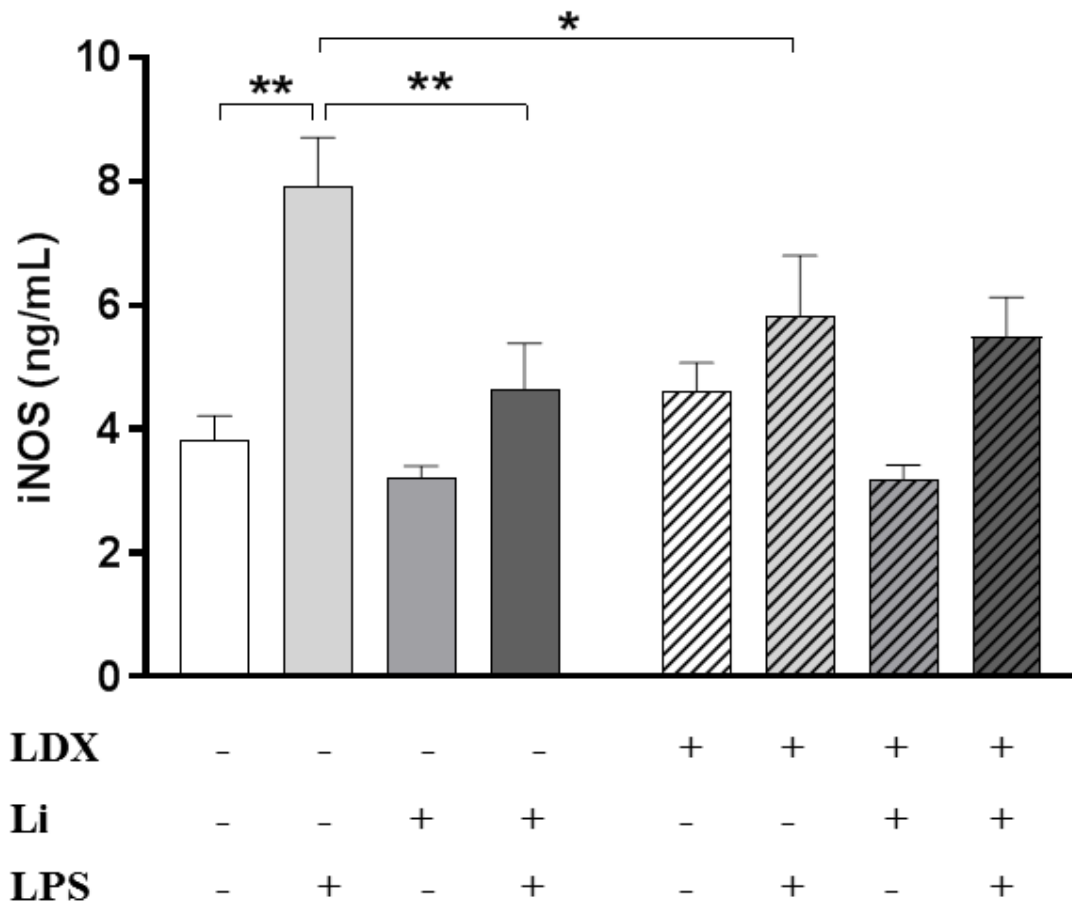


Figure 4. Serum iNOS levels after seven days of treatment with LDX + seven days of LDX and lithium, and a single administration of LPS.

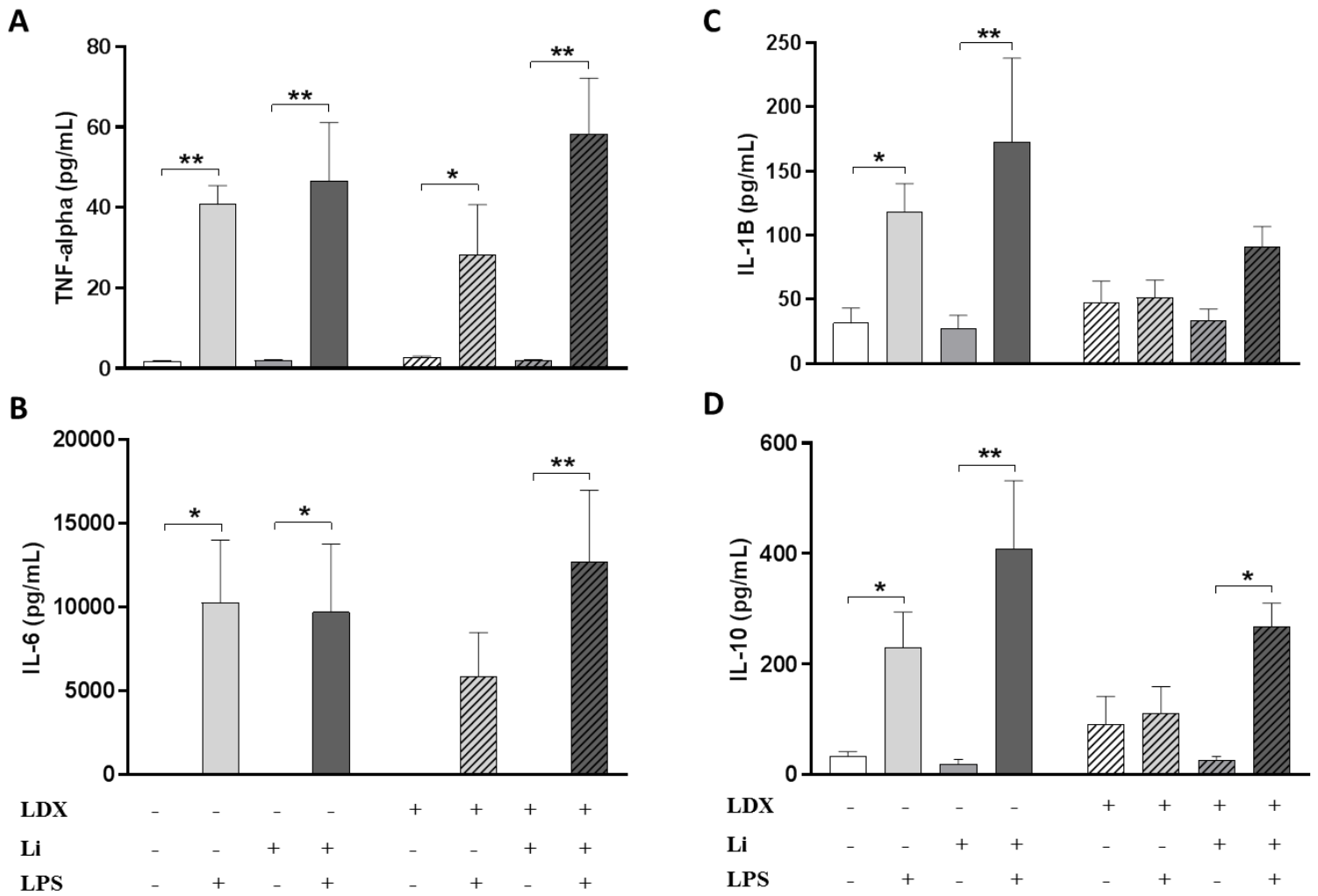


Figure 5. Serum TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10 levels after seven days of treatment with LDX + seven days of LDX and lithium, and a single administration of LPS.

3.2 Capítulo II

Padronização da técnica de imuno-histoquímica para a identificação de astrócitos e microglia em encéfalo de ratos

Resumo

O estudo de alterações celulares no sistema nervoso central (SNC) é de grande importância para o entendimento das doenças psiquiátricas. Nos últimos anos, pesquisas têm demonstrado o envolvimento das células gliais, como astrócitos e microglia, na fisiopatologia do transtorno bipolar (TB) e de outros transtornos mentais. Uma das maneiras de estudar estas alterações é por meio da utilização de modelos animais que mimetizem características da doença, como é o caso do modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina. Este tipo de estudo pode ser realizado utilizando técnicas como a imuno-histoquímica, que permite a identificação e visualização das células. Para isso, é necessária a padronização de condições experimentais ideais para o uso de anticorpos que permitam a marcação de células gliais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer as condições adequadas para a identificação de astrócitos e células microgliais no encéfalo de ratos, através do uso dos marcadores GFAP e Iba1, respectivamente; além de padronizar as condições experimentais para os anticorpos anti-iNOS e anti-arginase a fim de possibilitar a posterior classificação da microglia nos fenótipos pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2).

1. Introdução

O estudo de alterações celulares no sistema nervoso central (SNC) é fundamental para a compreensão de doenças psiquiátricas. Uma das maneiras de investigar alterações em células neuronais e gliais é através da indução de sintomas clássicos das doenças em animais, como é o caso do modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina. Por meio deste modelo, é possível mimetizar um episódio de mania e estudar alterações celulares no SNC que podem estar presentes nesta fase do transtorno bipolar (TB), assim como correlacionar estas mudanças com variações biológicas em nível periférico.

As células gliais, entre as quais se encontram os astrócitos e a microglia, são constituintes essenciais do SNC e estudos recentes evidenciam o possível envolvimento destas células na fisiopatologia e no tratamento do TB (Keshavarz, 2016). Desta forma, estudos são necessários para elucidar a contribuição destes tipos celulares na etiologia do transtorno e mecanismo de ação dos estabilizadores de humor, como o lítio.

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células da glia presentes no SNC dos mamíferos e compreendem um grupo heterogêneo de células que possuem variações no que diz respeito a sua morfologia, desenvolvimento, metabolismo e fisiologia. Os filamentos intermediários do citoesqueleto das células da glia, cujo componente principal é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Bondan *et al.*, 2003), são constituintes dos astrócitos maduros. A proteína GFAP está presente em uma série de tipos celulares do SNC, principalmente em astrócitos diferenciados, sendo considerada, portanto, o principal marcador destas células (Rodnight *et al.*, 1997).

As células da microglia, por sua vez, são consideradas os “macrófagos cerebrais”, pois são responsáveis pela fagocitose de micro-organismos invasores e pela retirada de restos celulares. Iba1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*) é uma proteína

ligadora de cálcio considerada um marcador de células microgлияis, visto que, do ponto de vista funcional, atualmente sabe-se que Iba1 é uma molécula essencial para a ativação da microglia (Imai & Kohsaka, 2002).

A microglia apresenta certo grau de plasticidade e pode polarizar para três diferentes fenótipos: M0, M1 e M2. O fenótipo M0 é dito protetor atenuado, uma vez que realiza a vigilância do microambiente cerebral e libera fatores neurotróficos importantes para a função cerebral (Franco & Fernandez-Suarez, 2015). Quando M0 é ativado - por lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo - ocorre polarização para um fenótipo pró-inflamatório denominado M1. Por outro lado, um estado anti-inflamatório - ou fenótipo M2 - pode ser induzido por IL-4 (M2a), LPS (M2b) ou IL-10 (M2c) (Cherry *et al.*, 2014; Nakagawa & Chiba, 2015).

A classificação fenotípica em macrófagos (microglia) M1 ou M2 pode ser concentrada em duas vias opostas do metabolismo de um aminoácido: a arginina. Os macrófagos podem metabolizar a arginina a óxido nítrico (NO) e citrulina através da enzima óxido nítrico sintase (NOS); ou a ornitina e ureia através da arginase. A preferência destas células no metabolismo da arginina define as mesmas como macrófagos M1 (NOS) ou M2 (arginase) e, desta forma, caracteriza estas enzimas como marcadores fenotípicos, sendo NOS marcador de macrófagos M1 e arginase marcador de macrófagos M2 (Mills 2012; Rath *et al.*, 2014).

Pesquisas recentes indicam que processos neuropatológicos em seus estágios iniciais estão associados à ativação de vias inflamatórias, as quais envolvem a ativação de astrócitos e da microglia, além da liberação de mediadores inflamatórios responsáveis também pela regulação da proliferação e hipertrofia de astrócitos. Evidências destes processos de caráter neuroinflamatório têm sido encontradas em uma série de transtornos neurológicos e psiquiátricos (Colangelo *et al.*, 2014; Okada *et al.*, 2006).

Sendo assim, evidências reforçam cada vez mais a participação das células gliais na fisiopatologia do TB. Além disso, estabilizadores de humor - como o lítio - podem estar exercendo seus efeitos terapêuticos através de sua ação sobre as células gliais. Por isso, torna-se fundamental investigar possíveis alterações gliais presentes no modelo animal de mania, bem como potenciais efeitos do lítio sobre estas alterações.

2. Objetivos

Os objetivos do trabalho que será apresentado neste capítulo foram:

- Estabelecer as condições adequadas para a identificação de astrócitos e células microgliais - através da utilização dos marcadores GFAP e Iba1, respectivamente - em encéfalo de ratos por meio da técnica de imuno-histoquímica;
- Padronizar as condições experimentais ideais para uso dos anticorpos anti-iNOS e anti-arginase a fim de possibilitar a posterior classificação da microglia nos fenótipos pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2).

3. Metodologia

3.1. Perfusão intracardíaca

Os ratos utilizados neste trabalho foram submetidos ao modelo animal de mania induzido por LDX, a tratamento com lítio e à administração de LPS, conforme explicado anteriormente nesta dissertação no capítulo I (páginas 34 e 35 desta dissertação). Na sequência, os ratos foram anestesiados (cetamina 100 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg) e a seguir perfundidos com solução salina 0,9 % (aproximadamente 100 mL/animal, com fluxo de 600 mL/hora) e paraformaldeído (PFA) 4 % em tampão fosfato (aproximadamente 100 mL/animal, com fluxo de 600 mL/hora) para realizar a pré-fixação tecidual. Ao término da perfusão, os animais foram decapitados e os

encéfalos retirados e colocados em frascos contendo PFA 4 %. Os encéfalos permaneceram na solução de PFA 4 % a 4 °C durante 24 horas.

3.2. Criopreservação do tecido encefálico

Após permanecerem durante 24 horas na solução de PFA 4 %, esta solução foi descartada e uma solução de sacarose 15 % foi adicionada aos frascos contendo os encéfalos (neste momento os encéfalos boiam, pois são menos densos do que a solução). Os encéfalos permaneceram nesta solução a 4 °C até afundarem (cerca de 24 horas), o que indica que ficaram mais densos que a solução, pois esta foi absorvida pelo tecido. Na sequência, a solução de sacarose 15 % foi descartada e uma solução de sacarose 30 % foi adicionada aos frascos.

Os encéfalos permaneceram na solução de sacarose 30 % a 4 °C até afundarem (cerca de 48 horas). Foram então retirados dos frascos, mergulhados em isopentano pré-gelado, embalados em papel alumínio e mantidos no freezer -20 °C até congelarem. A seguir, os encéfalos foram armazenados no freezer -80 °C.

3.3. Preparo das lâminas

A fim de habituar o tecido à temperatura de corte no criostato (entre -20 °C e -30 °C), os encéfalos foram retirados do freezer -80 °C e colocados no freezer -20 °C dois dias antes de serem seccionados. No criostato, foram adquiridas secções do córtex pré-frontal (CPF) com espessura de **20, 30, 40 e 50 µm** a fim de testar qual seria a mais adequada para a realização da técnica de imuno-histoquímica em tecido congelado. As secções foram dispostas em lâminas silanizadas - as quais consistem em lâminas tratadas com silano, um adesivo que permite a alta aderência do tecido -e armazenadas no freezer -20 °C até a realização da técnica.

3.4. Imunofluorescência em tecido congelado

Antes de iniciar a realização da técnica de imunofluorescência, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Para a realização das marcações das células de interesse (astrócitos e microglia), foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-GFAP (G9269; Sigma-Aldrich), anti-Iba1 (ab15690; Abcam), anti-arginase (ab91279; Abcam) e anti-iNOS (ab15323; Abcam); e os anticorpos secundários: Anticorpo conjugado com Alexa flúor 488 contra camundongo (Alexa Fluor™ 488 Goat anti-mouse - ab150113, Abcam) e anticorpo conjugado com Alexa flúor 555 contra coelho (Alexa Fluor™ 555 goat anti-rabbit IgG (H+L) – A21429, Life Technologies).

O protocolo utilizado será descrito a seguir, sendo que em certas etapas serão citadas as diferentes condições testadas. Na seção “Resultados” serão destacadas as condições que possibilitaram a obtenção de marcações adequadas.

- a) **Permeabilização:** As lâminas contendo secções do CPF foram incubadas com PBS contendo diferentes concentrações - **0,1 %, 0,2 %, 0,3 % ou 0,4 % - de Triton X-100 (PBST)** durante 5 minutos (Triton X-100 é o detergente mais popular utilizado para permitir a penetração do anticorpo nas células). A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, 5 minutos cada lavagem.
- b) **Bloqueio:** As lâminas foram então incubadas com PBST (0,1 %, 0,2 %, 0,3 ou 0,4 %) contendo **leite em pó desnatado 10 % ou albumina sérica bovina (BSA) 5%** durante **30 minutos ou 1 hora**, a fim de bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos.
- c) **Incubação com anticorpos primários:** As lâminas foram incubadas durante **14 ou 18 horas** em câmara úmida a 4 °C com os anticorpos primários de interesse

diluídos - em diferentes concentrações - em PBST contendo leite em pó desnatado 10 % ou BSA 5 %. Para todas as marcações foram realizados sempre controles negativos.

Os anticorpos primários e diluições testadas foram os seguintes:

Anti-GFAP: 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000;

Anti-Iba1: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200;

Anti-arginase: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800;

Anti-iNOS: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, 5 minutos cada lavagem.

- d) ***Incubação com anticorpos secundários:*** Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários apropriados diluídos **1:500 ou 1:1000** em PBST com leite em pó desnatado 10 % ou BSA 5 % durante **1 hora ou 2 horas** à temperatura ambiente e no escuro. O anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488 foi usado nas secções previamente incubadas com o anticorpo primário anti-Iba1; e o anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 555 foi utilizado nas secções que haviam sido incubadas anteriormente com o anticorpo primário anti-GFAP ou anti-iNOS ou anti-arginase.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, 5 minutos cada lavagem.

- e) ***Marcação com Hoechst:*** As secções foram incubadas com 2,5 ug/mL de Hoechst (Hoechst 33258 – H1398 – Invitrogen) durante 10 minutos. Logo em seguida foi realizada uma lavagem com PBS.

f) **Montagem das lâminas:** Por fim, foi realizada a montagem das lâminas, e estas foram armazenadas no escuro a 4 °C até a análise no microscópio confocal.

3.5. Análise das lâminas por microscopia confocal

A análise das lâminas foi realizada usando o microscópio confocal Leica TCS SP5, utilizando a objetiva de 40x. As marcações referentes à Iba1 foram adquiridas usando a linha de laser 488 nm de um laser argônio, e para as marcações referentes a GFAP, arginase e iNOS foi usada a linha de laser 561 nm de um laser diodo. Para a visualização dos núcleos marcados com Hoechst foi utilizada a linha de laser UV.

4. Resultados

Após a visualização das lâminas, concluímos que, dentre as condições testadas nas diversas etapas, as mais adequadas para a obtenção das marcações são as seguintes:

- Tamanho do corte no criostato: 30 µm
- Permeabilização: PBST 0,3 %;
- Bloqueio: Leite desnatado 10 % durante 1 hora;
- Incubação com anticorpos primários: duração de 18 horas, nas seguintes

diluições para cada anticorpo:

Anti-GFAP: 1:500;

Anti-Iba1: 1:50;

Anti-arginase: 1:400;

Anti-iNOS: 1:50.

- Incubação com anticorpos secundários: duração de 2 horas, na diluição 1:500.

Para todas as marcações também foi testada a recuperação antigênica com citrato de sódio (antes da marcação com os anticorpos primários). No entanto, a adição deste procedimento ao protocolo não representou melhora nas marcações/imagens.

A seguir, constam as imagens obtidas com as melhores condições citadas anteriormente para cada anticorpo.

• GFAP

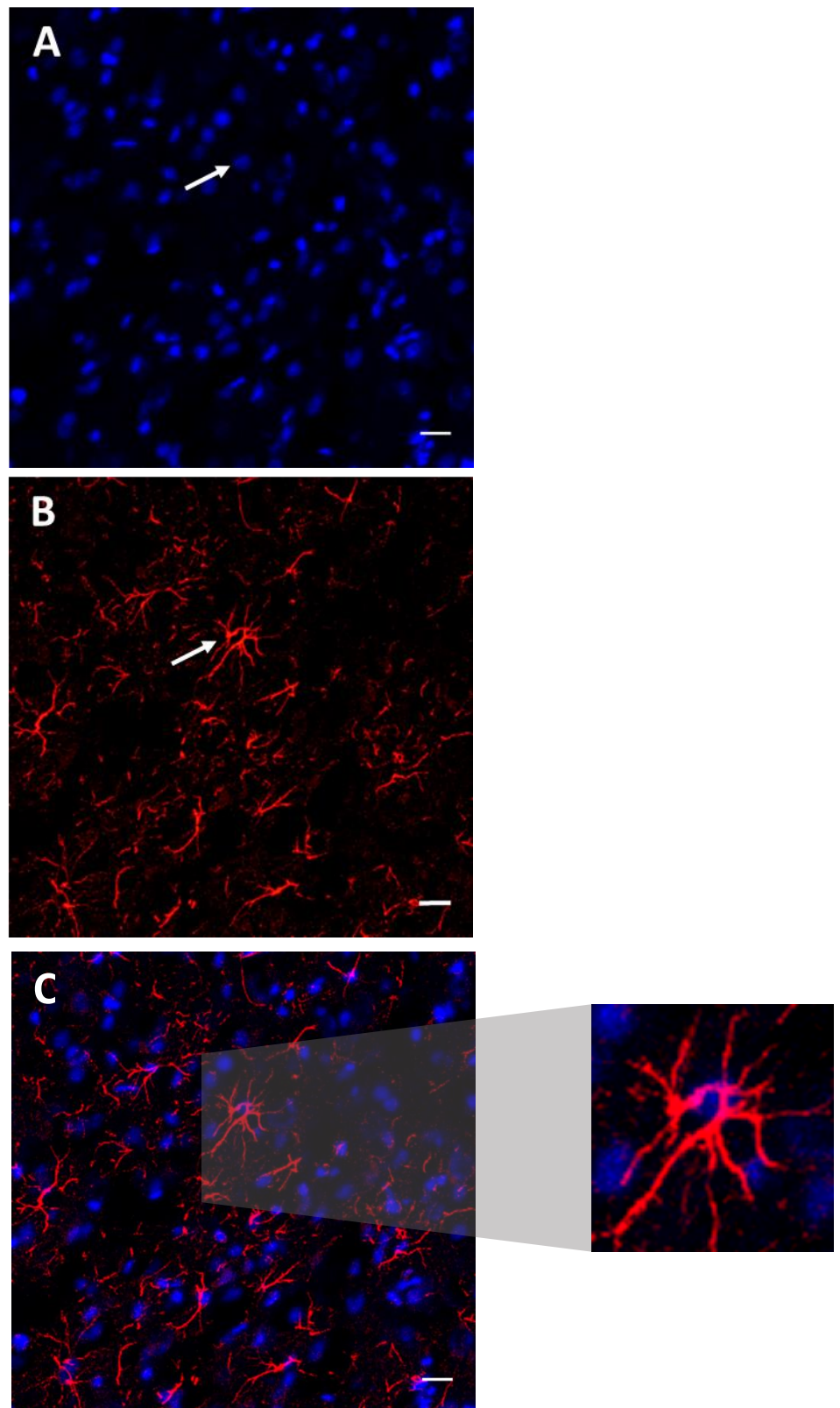


Figura 1: Hoechst, seta indica marcação do núcleo (A); GFAP 1:500, seta aponta um astrócito (B); Merge Hoechst + GFAP 1:500, destacando um astrócito (C). Barra de escala = 20 μm .

• Iba1

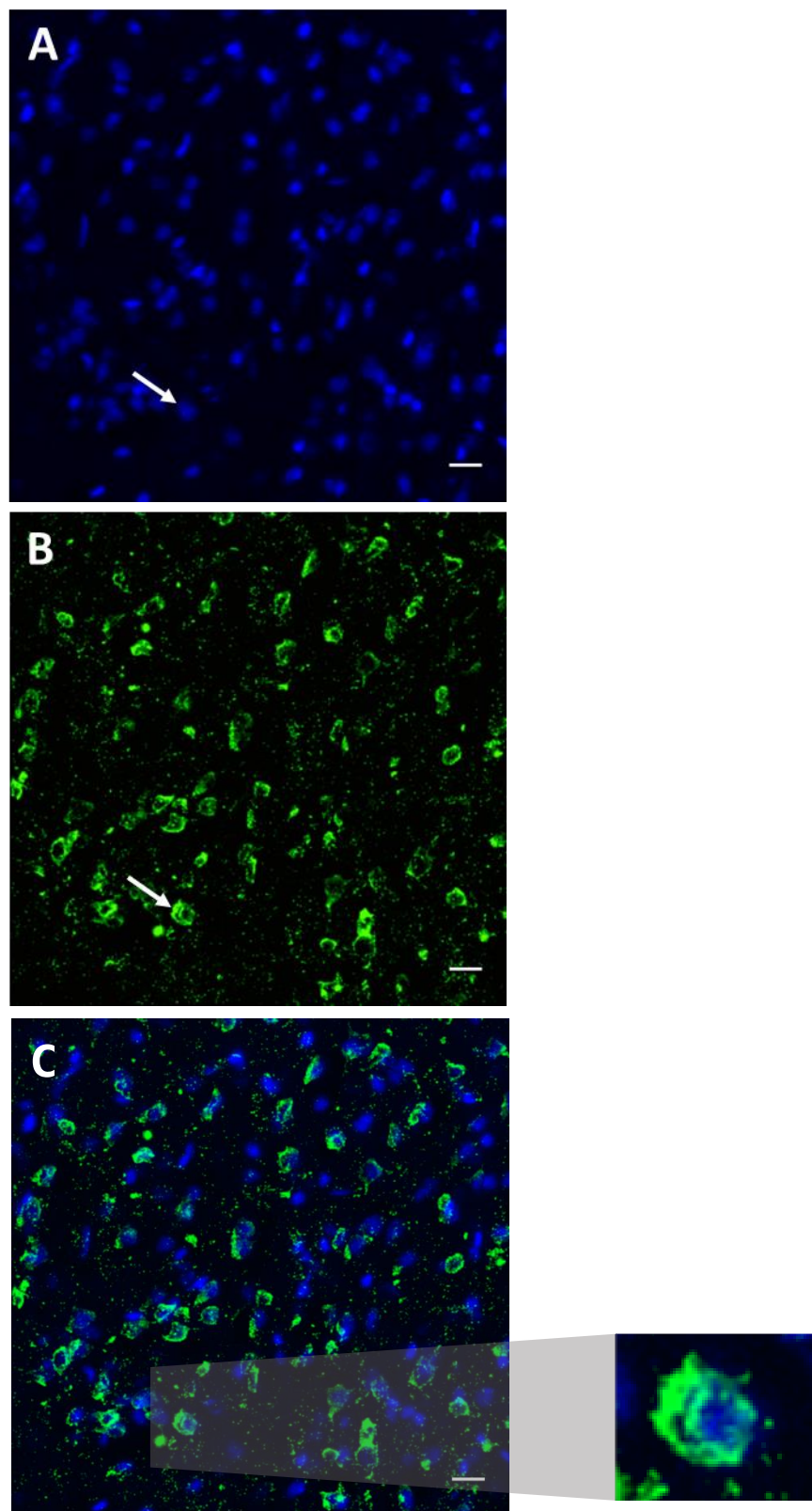


Figura 2: Hoechst, seta indica marcação do núcleo (A); Iba1 1:50, seta aponta microglia (B); Merge Hoechst + Iba1 1:50, destacando uma célula microglial (C). Barra de escala = 20 μ m.

- Arginase

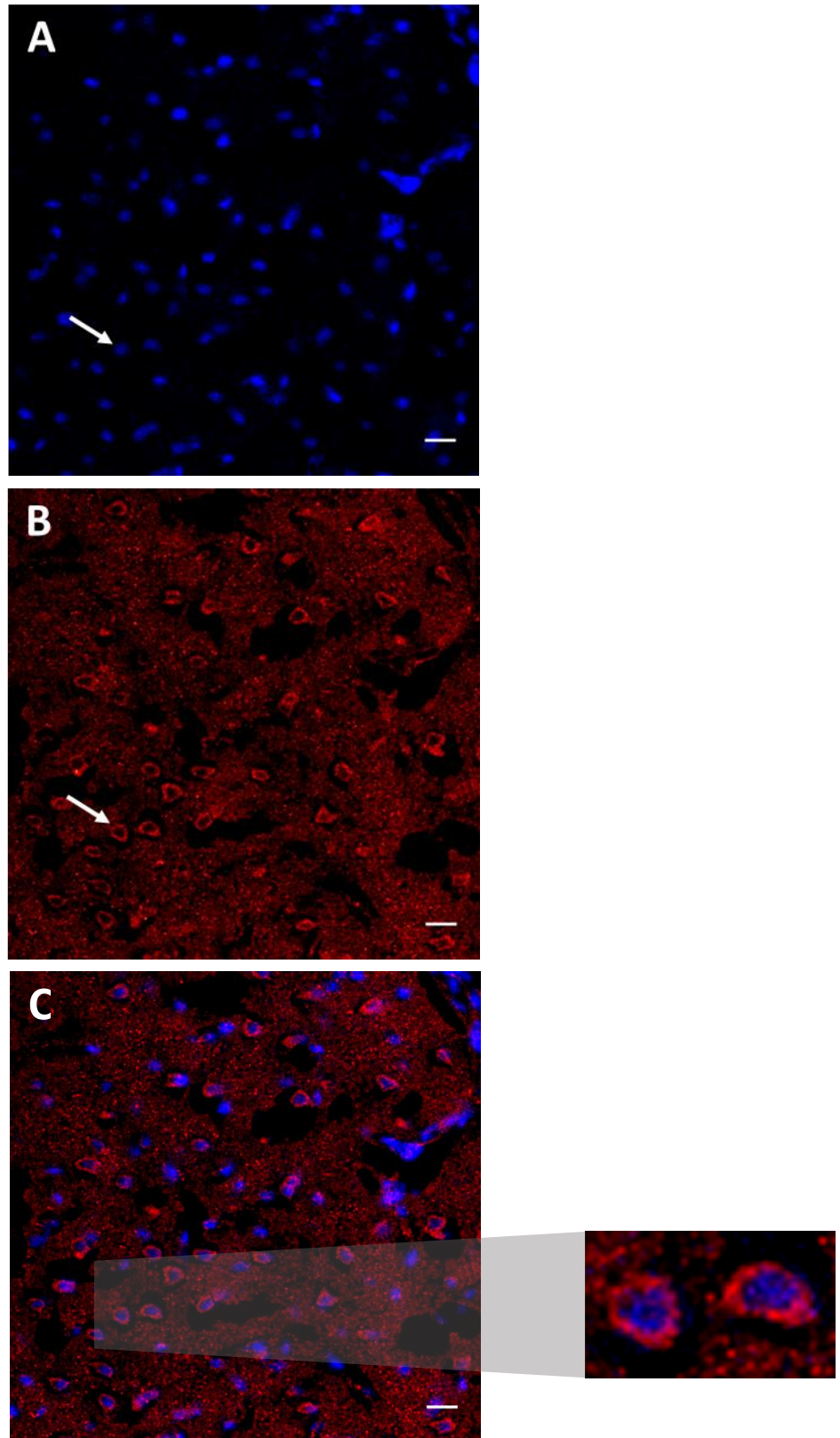


Figura 3: Hoechst, seta indica marcação do núcleo (A); Arginase 1:400, seta aponta microglia M2 (B); Merge Hoechst + Arginase 1:400, em destaque microglia M2 (C). Barra de escala = 20 μ m.

• iNOS

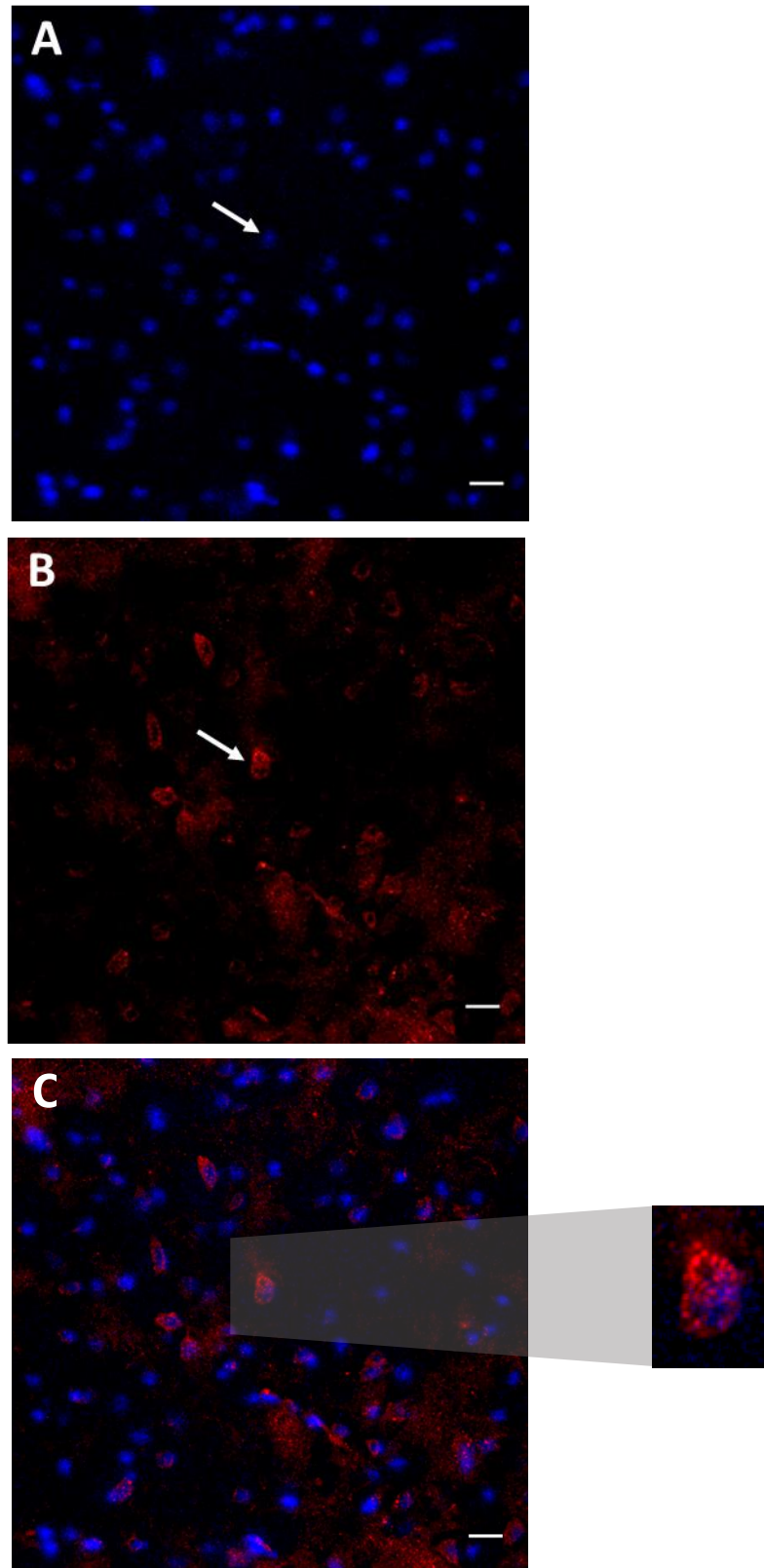


Figura 4: Hoechst, seta indica marcação do núcleo (A); iNOS 1:50, seta aponta microglia M1 (B); Merge Hoechst + iNOS 1:50, em destaque microglia M1 (C). Barra de escala = 20 μ m.

5. Referências

- Bondan, E. F., M. A. Lallo, M. L. Dagli, M. Sanchez and D. L. Graça, 2003. Investigation into the Astrocytic Immunoreactivity to Gfap and Vimentin in the Brainstem of Wistar Rats Submitted to the Ethidium Bromide Gliotoxic Model. *Arq Neuropsiquiatr* Vol. 61, No. 3A, pp. 642-9.
- Cherry, J. D., J. A. Olschowka and M. K. O'Banion, 2014. Neuroinflammation and M2 Microglia: The Good, the Bad, and the Inflamed. *J Neuroinflammation* Vol. 11, pp. 98.
- Colangelo, A. M., L. Alberghina and M. Papa, 2014. Astroglisis as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases. *Neurosci Lett* Vol. 565, pp. 59-64.
- Franco, R. and D. Fernandez-Suarez, 2015. Alternatively Activated Microglia and Macrophages in the Central Nervous System. *Prog Neurobiol* Vol. 131, pp. 65-86.
- Imai, Y. and S. Kohsaka, 2002. Intracellular Signaling in M-CSF-Induced Microglia Activation: Role of Iba1. *Glia* Vol. 40, No. 2, pp. 164-74.
- Keshavarz, M., 2016. Glial Cells as Key Elements in the Pathophysiology and Treatment of Bipolar Disorder. *Acta Neuropsychiatr*, pp. 1-13.
- Mills, C. D., 2012. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol* Vol. 32, No. 6, pp. 463-88.
- Nakagawa, Y. and K. Chiba, 2015. Diversity and Plasticity of Microglial Cells in Psychiatric and Neurological Disorders. *Pharmacol Ther* Vol. 154, pp. 21-35.
- Okada, S., M. Nakamura, H. Katoh, T. Miyao, T. Shimazaki, K. Ishii, J. Yamane, A. Yoshimura, Y. Iwamoto, Y. Toyama and H. Okano, 2006. Conditional Ablation of Stat3

or Socs3 Discloses a Dual Role for Reactive Astrocytes after Spinal Cord Injury. *Nat Med* Vol. 12, No. 7, pp. 829-34.

Rath, M., I. Muller, P. Kropf, E. I. Closs and M. Munder, 2014. Metabolism Via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* Vol. 5, pp. 532.

Rodnight, R., C. A. Gonçalves, S. T. Wofchuk and R. Leal, 1997. Control of the Phosphorylation of the Astrocyte Marker Glial Fibrillary Acidic Protein (Gfap) in the Immature Rat Hippocampus by Glutamate and Calcium Ions: Possible Key Factor in Astrocytic Plasticity. *Braz J Med Biol Res* Vol. 30, No. 3, pp. 325-38.

PARTE III

4. DISCUSSÃO

O TB está sendo cada vez mais associado a um alto índice de comorbidades médicas, como doenças autoimunes, cardiovasculares, diabetes e disfunção metabólica (Crump *et al.*, 2013; Rosenblat & McIntyre, 2016). Uma série de vias biológicas pode colaborar para esta associação, sendo que as vias relacionadas à inflamação parecem exercer um papel chave neste aspecto e, conseqüentemente, na fisiopatologia do TB.

Os resultados obtidos nas análises do *open-field* relativas a número de *crossings* e de *rearings* mostram que o LDX foi capaz de induzir hiperatividade nos ratos, uma vez que os animais tratados com este composto apresentaram um aumento significativo no número de *crossings* e uma tendência ao aumento no número de *rearings*, conforme já demonstrado também por Macêdo e colaboradores (Macêdo *et al.*, 2013). Os efeitos “tipo-maniacos” observados no comportamento ocorrem provavelmente devido ao aumento nos níveis de dopamina extracelular causados pela administração do psicoestimulante LDX. Similarmente, pacientes bipolares apresentam aumento da atividade dopaminérgica quando estão em episódio maníaco (Engmann, 2011).

Com estes resultados, foi possível verificar a validade aparente deste modelo animal de mania, pois o comportamento apresentado pelos animais é semelhante a sintomas vistos em pacientes com TB, representado pela hiperatividade. Também foi observada uma boa validade preditiva, pois o lítio foi capaz de reverter as alterações comportamentais apresentadas.

No entanto, neste trabalho não foi observada a validade interpretativa, isso porque as bases biológicas da doença (ainda que estas não estejam bem definidas) não foram mimetizadas. O LDX não influenciou os níveis de citocinas inflamatórias e ocasionou um aumento dos níveis de BDNF, diferentemente do observado em pacientes bipolares

em episódios de humor, em que já foi relatada a elevação dos níveis de citocinas em estudos distintos (Brietzke *et al.*, 2009; Ortiz-Domínguez *et al.*, 2007) e a diminuição dos níveis de BDNF (Cunha *et al.*, 2006; de Oliveira *et al.*, 2009). É esperado, em certa medida, que o modelo reproduza apenas parte da biologia de uma condição complexa como o TB; e assim, sugere-se que este modelo não foi apropriado para avaliar as alterações inflamatórias associadas ao TB. Essa dificuldade pode estar relacionada à diferença no fármaco utilizado no modelo, ao tempo de tratamento (situação aguda vs. cronicidade), ao tipo de insulto induzido, entre outros fatores.

Neste modelo, o LDX não induziu um perfil inflamatório nos animais, não influenciando os níveis séricos de citocinas inflamatórias, diferentemente do encontrado por Valvassori e colaboradores, em que a administração de dextroanfetamina resultou no aumento dos níveis de citocinas inflamatórias no soro e em estruturas cerebrais (Valvassori *et al.*, 2015). De maneira oposta, o LDX parece apresentar inclusive uma tendência a proteger o organismo de um insulto inflamatório causado pela administração de LPS, tendo em vista que os animais que receberam este composto não tiveram aumento nos níveis séricos de iNOS e pôde ser notada uma tendência do LDX em evitar o aumento de citocinas, em especial de IL-6, IL-1 β e IL-10.

O LPS é uma endotoxina que mimetiza uma infecção por bactéria gram-negativa e assim estimula as células do sistema imune a liberarem citocinas tais como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 (Barsig *et al.*, 1995; Moraes *et al.*, 2017) e aumenta os níveis de iNOS (Saha & Pahan, 2006). Sendo assim, hipotetizamos que o LDX esteja de certa forma protegendo o organismo, uma vez que parece evitar este aumento nos níveis de mediadores inflamatórios.

Além disso, contrário a um estudo realizado com este mesmo modelo no qual foi observada uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo de ratos (de Souza *et al.*,

2015), no nosso estudo o LDX causou um aumento nos níveis séricos de BDNF. No entanto, conforme mencionado anteriormente nesta dissertação, estudos realizados em outros modelos animais que utilizaram anfetamina suportam nosso achado, se assumirmos uma relação entre os níveis centrais e periféricos. Em ratos, expressão aumentada do gene do BDNF foi encontrada na amígdala, córtex piriforme e hipotálamo de ratos após a exposição repetida à anfetamina (Meredith *et al.*, 2002); assim como foi visto um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo (McFadden *et al.*, 2014) e no estriado dorsal (Krasnova *et al.*, 2013) após a administração de metanfetamina. Além disso, um estudo realizado em humanos demonstrou que usuários de metanfetamina apresentam níveis séricos de BDNF significativamente maiores em relação a controles saudáveis (Ren *et al.*, 2016).

Uma das hipóteses para o aumento dos níveis de BDNF em decorrência da administração de LDX é de que isto ocorra como um mecanismo compensatório em resposta ao potencial estímulo neurotóxico causado pelo psicoestimulante. Diferentes estudos já discutiram o aumento dos níveis de BDNF como uma maneira de proteger o organismo, em especial o SNC, de um insulto (Braun *et al.*, 2011; Canals *et al.*, 2001; Martinez-Serrano & Bjorklund, 1996; Perez-Navarro *et al.*, 2000). O aumento na expressão e/ou nos níveis de BDNF após diferentes insultos ao SNC é frequentemente associado à neuroproteção e à neuroplasticidade (Braun *et al.*, 2011; Canals *et al.*, 2001; Martinez-Serrano & Bjorklund, 1996; Perez-Navarro *et al.*, 2000), a qual consiste na capacidade do cérebro manter-se em desenvolvimento, adaptar-se e potencialmente recuperar-se de danos (Calabrese *et al.*, 2014). Os fatores neurotróficos são essenciais para a neuroplasticidade, pois modulam o crescimento e remodelamento axonal e dendrítico, a liberação de neurotransmissores e a formação de sinapses (Lu *et al.*, 2005). Entre esses fatores, o BDNF aparenta ter uma função crucial na mediação da

plasticidade neuronal, por ser abundante em regiões cerebrais relevantes para a neuroplasticidade (Bramham & Messaoudi, 2005), além de ser considerado um potencial modulador da resposta inflamatória em nível transcricional e celular (Jiang *et al.*, 2010).

As citocinas são mediadores regulatórios chave na resposta imunológica, além de possuírem uma importante função na comunicação entre o sistema imune e o SNC. As citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, podem afetar a integração correta de novos neurônios em circuitos existentes, assim como a capacidade do ambiente neuronal responder a um insulto e se readaptar (Calabrese *et al.*, 2014).

TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 são exemplos de citocinas as quais vêm sendo bastante estudadas nos transtornos psiquiátricos (Cheslack-Postava *et al.*, 2016; Kohler *et al.*, 2017). TNF- α , IL-6 e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias que podem colaborar para o processo de morte neuronal, levando a uma disfunção cerebral (Kim *et al.*, 2017). TNF- α é responsável por iniciar e regular a cascata de citocinas durante uma resposta inflamatória (Makhatadze, 1998), ao passo que a IL-6 possui efeitos regulatórios na resposta inflamatória (Hammacher *et al.*, 1994; Raivich *et al.*, 1999). De forma similar, a IL-1 β é capaz de suprimir a proliferação celular no hipocampo e media o comportamento tipo-depressivo em modelo animal agudo e crônico de estresse (Koo & Duman, 2008). Por outro lado, a IL-10 possui propriedades anti-inflamatórias e ajuda a suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias e limitar a resposta imune (Saraiva & O'Garra, 2010). Adicionalmente, o NO também é um modulador da inflamação e sua produção pode ser devida à expressão da iNOS induzida por citocinas, LPS, ou outros compostos (Kleinert *et al.*, 2003).

Alterações nos níveis destas moléculas pode danificar a estrutura e função neuronal, levando a déficits de neuroplasticidade. Desta forma, o fato de o LDX ter evitado o

aumento dos níveis séricos de iNOS e tender a evitar o aumento de IL-6, IL-1 β e IL-10 em resposta à ativação imune causada pela administração de LPS pode ter ocorrido devido a um mecanismo pelo qual o aumento prévio de BDNF endógeno pode estar modulando a ativação imune causada pela administração de LPS.

Este aumento nos níveis de BDNF em resposta à administração de LDX pode ter ocorrido através da modulação de um fator de transcrição relacionado à ativação da expressão do gene do BDNF: a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) (Tao *et al.*, 1998). Estudos mostraram que a anfetamina conduz a um aumento nos níveis de CREB fosforilado (Choe *et al.*, 2002; Shi & McGinty, 2007), o que ocorre devido à ativação de enzimas cinase como a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), a proteína cinase C (PKC) e as calmodulinas cinases (CaMKs), que promovem a fosforilação e ativação de CREB.

Conforme abordado anteriormente, o CREB está envolvido numa série de processos celulares, relacionados à plasticidade sináptica, às respostas adaptativas imunológicas e à sobrevivência celular (Mayr & Montminy, 2001; Wen *et al.*, 2010). A importância e função do CREB na inflamação pode ser explicada em parte pelo fato deste fator de transcrição possuir o mesmo coativador que o fator nuclear κ B (NF- κ B), o qual é considerado um dos principais reguladores da transcrição de genes relacionados à resposta inflamatória (Lawrence, 2009). Por isso, CREB e NF- κ B competem pelo mesmo coativador, a proteína ligadora de CREB (CBP). Quando CREB é fosforilado, ele irá ligar-se à CBP, diminuindo a quantidade deste coativador livre. Como a quantidade de CBP é limitada, haverá menos coativador disponível para ligar NF- κ B. Desta forma, as ações que seriam orquestradas pelo NF- κ B - como a estimulação da expressão de genes proinflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Lawrence, 2009) – são inibidas ou ocorrem em uma menor dimensão. Isso faz

com que haja uma redução na expressão de citocinas e iNOS, por exemplo, e consequentemente um decréscimo na liberação de citocinas pró-inflamatórias e síntese de NO (Parry & Mackman, 1997; Wen *et al.*, 2010).

De acordo com outros estudos, encontramos níveis aumentados dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 e iNOS nos animais que receberam LPS (Andre *et al.*, 2008; Biesmans *et al.*, 2013; Erickson & Banks, 2011; Jung *et al.*, 2016). O LPS é reconhecido pelas células imunes por meio de receptores, destacando-se classicamente o receptor tipo Toll 4 (TLR4). A ligação de LPS aos receptores TLR4 leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B, e na sequência a produção de mediadores inflamatórios é estimulada. IL-1 β , IL-6 e TNF- α estão envolvidas na fase aguda da inflamação, e seus níveis começam a aumentar logo em seguida à administração de LPS; a IL-10 também tem sua expressão e secreção aumentada a fim de controlar a duração e a intensidade da resposta inflamatória (Biesmans *et al.*, 2013).

O lítio, tratamento padrão ouro para o tratamento do TB, aparenta ter propriedades anti-inflamatórias, uma vez que estudos demonstraram a capacidade deste composto em reduzir marcadores inflamatórios (Albayrak *et al.*, 2013; Kaplanski *et al.*, 2014; Nahman *et al.*, 2012). Entretanto, em nosso estudo, uma concentração terapêutica de lítio preveniu o aumento nos níveis de iNOS, mas não foi capaz de prevenir o aumento de citocinas causado pela administração de LPS. Em um estudo conduzido por Nahman e colaboradores, foi reportado que o lítio atuou na redução da expressão de iNOS em experimentos *in vitro*, bem como foi capaz de diminuir a liberação de TNF- α e IL-1 β , porém deve ser considerado que estes resultados foram observados com a utilização de uma concentração de lítio acima da terapêutica (Nahman *et al.*, 2012).

Um dos mecanismos de ação sugeridos para suportar as potenciais propriedades anti-inflamatórias do lítio é via GSK-3 β , uma cinase inibida por este composto. A

inibição desta enzima possivelmente diminui a ativação do NF- κ B, resultando na redução da secreção de mediadores inflamatórios e também na supressão da atividade da iNOS (Wang *et al.*, 2013). A inflamação está cada vez mais sendo considerada um fator chave na fisiopatologia do TB e por isso vários estudos atribuem parte da eficácia do lítio no tratamento do TB ao seu provável potencial anti-inflamatório (Nassar & Azab, 2014). No entanto, há também dados mostrando que este composto não afeta os marcadores inflamatórios (Guloksuz *et al.*, 2010) ou que ainda estimula a produção de mediadores proinflamatórios (Beyaert *et al.*, 1991, Kleinerman *et al.*, 1989).

Uma recente revisão sistemática destacou que não foi possível concluir sobre o efeito do uso do lítio nos níveis de citocinas inflamatórias em pacientes bipolares, pois a maioria dos estudos relacionados ao tópico foi conduzida em pacientes eutímicos e em uso crônico de lítio (van den Aemele *et al.*, 2016). Os autores desta revisão também destacaram a necessidade de estudar pacientes em uso agudo do lítio para melhor investigar as ações desta droga, apesar de se ter conhecimento que uma boa resposta clínica ao lítio tem sido correlacionada positivamente com a normalização da atividade do sistema imune (van den Aemele *et al.*, 2016).

Além disso, o lítio demonstrou influenciar os níveis de BDNF em diversos estudos (de Souza Gomes *et al.*, 2015; Frey *et al.*, 2006a), fato este não observado em nosso experimento. Em nosso modelo, isto pode ter ocorrido em função do curto período de tempo em que os animais receberam lítio (7 dias), período que provavelmente não foi suficiente para afetar os níveis séricos desta neurotrofina. Esta hipótese é baseada em um estudo realizado por Fukumoto e colaboradores, no qual foi reportado que o tratamento agudo com lítio (7 dias) não afetou a expressão de BDNF no hipocampo e no córtex frontal de ratos, porém o tratamento crônico com lítio (14 a 28 dias) aumentou a expressão de BDNF nessas estruturas (Fukumoto *et al.*, 2001).

Tendo em vista os resultados deste trabalho, o modelo animal de mania induzido por LDX causou um aumento nos níveis de BDNF, contrário ao observado em pacientes bipolares em episódio de humor. Além disso, este modelo não representou um meio adequado para o estudo da inflamação, pois LDX não induziu um perfil inflamatório nos animais, limitando o estudo dos efeitos do lítio neste modelo. Desta maneira, apesar de as evidências presentes na literatura indicarem o lítio como inibidor ou atenuador de vias importantes para o processo inflamatório, e de neste trabalho este composto ter evitado o aumento de iNOS, mais estudos são necessários para investigar o potencial anti-inflamatório do lítio em outras condições experimentais.

5. CONCLUSÕES

- O tratamento de ratos com LDX induziu hiperatividade: aumentou o número de *crossings* e apresentou uma tendência a aumentar o número de *rearings*. O tratamento com lítio foi capaz de reverter este comportamento;
- A administração de LPS, conforme esperado, ocasionou uma ativação imune sistêmica, conforme pôde ser verificado pelo aumento dos níveis séricos de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10) e de iNOS;
- LDX não induziu um perfil inflamatório nos animais, por isso não é possível concluir sobre o potencial efeito anti-inflamatório do lítio neste modelo de mania. No entanto, LDX evitou o aumento dos níveis séricos de iNOS e apresentou uma tendência a evitar a elevação das citocinas inflamatórias decorrentes da ativação imune com LPS;
- Os ratos tratados com LDX apresentaram níveis séricos aumentados de BDNF. Nossa hipótese para este achado é de que estes níveis de BDNF representam um mecanismo compensatório de neuroproteção endógena em resposta ao potencial insulto neurotóxico decorrente da administração de LDX;
- O lítio preveniu o aumento dos níveis séricos de iNOS causado pela ativação imune sistêmica (administração de LPS), o que indica que este composto parece apresentar propriedade anti-inflamatória. No entanto, o lítio não preveniu o aumento de citocinas inflamatórias causado pela administração de LPS; e tampouco teve influência sobre os níveis séricos de BDNF, o que pode ter ocorrido devido ao período curto de tratamento com lítio;
- Os resultados apresentados nesta dissertação sugerem que o modelo animal de mania induzido por LDX causa um aumento nos níveis de BDNF. Os dados sugerem também

que este modelo não apresenta perfil inflamatório e que, inclusive, LDX parece exercer uma proteção frente à ativação imune sistêmica. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o lítio apresenta potencial propriedade anti-inflamatória.

- Nesta dissertação também foi realizada a padronização da técnica de imunohistoquímica para a identificação de células microgliais e astrócitos no cérebro de ratos. Assim, o marcador GFAP possibilitará a identificação de astrócitos e o Iba1 a identificação da microglia; e iNOS e arginase permitirão a classificação da microglia em fenótipo M1 (proinflamatório) e M2 (anti-inflamatório), respectivamente.

6. PERSPECTIVAS

No capítulo II foi descrita a padronização da técnica de imunofluorescência para a identificação de astrócitos usando o anticorpo anti-GFAP e a das células microgliais por meio do anticorpo anti-Iba1. Além disso, foram padronizados os anticorpos para possibilitar a classificação da microglia em fenótipo próinflamatório (M1, anticorpo anti-iNOS) e anti-inflamatório (M2, anticorpo anti-arginase).

A partir de agora, pretendemos usar a técnica padronizada para investigar possíveis alterações quantitativas e morfológicas decorrentes da administração de LDX (modelo animal de mania) nos astrócitos e na microglia em estruturas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo), assim como estudar alterações fenotípicas na microglia. Além disso, será investigado se o lítio causa alguma alteração nas células gliais citadas, e se possui potencial efeito anti-inflamatório no SNC, através da utilização dos marcadores fenotípicos de microglia iNOS e arginase.

Conforme foi apresentado neste trabalho, em nível periférico, o lítio foi capaz de evitar o aumento de iNOS decorrente de uma ativação imune sistêmica causada pela administração de LPS. Com o uso da imunofluorescência, poderemos ver se o lítio é capaz de atenuar a polarização microglial para o fenótipo M1 (próinflamatório) - evitando o aumento de iNOS também em nível central - e favorecer o fenótipo M2 (anti-inflamatório). Desta forma, será possível verificar se o lítio possui alguma propriedade anti-inflamatória e até mesmo neuroprotetora, e se há relação entre os resultados obtidos nas análises séricas e os obtidos em tecido cerebral.

REFERÊNCIAS

Albayrak, A., Z. Halici, B. Polat, E. Karakus, E. Cadirci, Y. Bayir, S. Kunak, S. S. Karcioğlu, S. Yigit, D. Unal and S. S. Atamanalp. (2013), 'Protective Effects of Lithium: A New Look at an Old Drug with Potential Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects in an Animal Model of Sepsis', *Int Immunopharmacol* Vol. 16, No. 1, pp. 35-40.

Andre, C., J. C. O'Connor, K. W. Kelley, J. Lestage, R. Dantzer and N. Castanon. (2008), 'Spatio-Temporal Differences in the Profile of Murine Brain Expression of Proinflammatory Cytokines and Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Response to Peripheral Lipopolysaccharide Administration', *J Neuroimmunol* Vol. 200, No. 1-2, pp. 90-9.

APA, A. P. A. (2014), *Manual Diagnóstico E Estatístico De Transtornos Mentais: Dsm-5*. 5ª ed., Artmed.

Baastrup, P. C. and M. Schou. (1967), 'Lithium as a Prophylactic Agents. Its Effect against Recurrent Depressions and Manic-Depressive Psychosis', *Arch Gen Psychiatry* Vol. 16, No. 2, pp. 162-72.

Barbosa, I. G., M. E. Bauer, R. Machado-Vieira and A. L. Teixeira. (2014), 'Cytokines in Bipolar Disorder: Paving the Way for Neuroprogression', *Neural Plast* Vol. 2014, pp. 360481.

Barsig, J., S. Kusters, K. Vogt, H. D. Volk, G. Tiegs and A. Wendel. (1995), 'Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-10 in Mice: Role of Endogenous Tumor Necrosis Factor-Alpha', *Eur J Immunol* Vol. 25, No. 10, pp. 2888-93.

- Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov. (2011), 'The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors', *Pharmacol Rev* Vol. 63, No. 1, pp. 182-217.
- Belmaker, R. H. (2004), 'Bipolar Disorder', *N Engl J Med* Vol. 351, No. 5, pp. 476-86.
- Beurel, E. (2011), 'Regulation by Glycogen Synthase Kinase-3 of Inflammation and T Cells in Cns Diseases', *Front Mol Neurosci* Vol. 4.
- Beyaert, R., K. Schulze-Osthoff, F. Van Roy and W. Fiers. (1991), 'Lithium Chloride Potentiates Tumor Necrosis Factor-Induced and Interleukin 1-Induced Cytokine and Cytokine Receptor Expression', *Cytokine* Vol. 3, No. 4, pp. 284-91.
- Biesmans, S., T. F. Meert, J. A. Bouwknecht, P. D. Acton, N. Davoodi, P. De Haes, J. Kuijlaars, X. Langlois, L. J. Matthews, L. Ver Donck, N. Hellings and R. Nuydens. (2013), 'Systemic Immune Activation Leads to Neuroinflammation and Sickness Behavior in Mice', *Mediators Inflamm* Vol. 2013, pp. 271359.
- Bondan, E. F., M. A. Lallo, M. L. Dagli, M. Sanchez and D. L. Graça. (2003), '[Investigation into the Astrocytic Immunoreactivity to Gfap and Vimentin in the Brainstem of Wistar Rats Submitted to the Ethidium Bromide Gliotoxic Model]', *Arq Neuropsiquiatr* Vol. 61, No. 3A, pp. 642-9.
- Bowden, C. L., A. C. Swann, J. R. Calabrese, S. L. McElroy, D. Morris, F. Petty, R. M. Hirschfeld and L. Gyulai. (1997), 'Maintenance Clinical Trials in Bipolar Disorder: Design Implications of the Divalproex-Lithium-Placebo Study', *Psychopharmacol Bull* Vol. 33, No. 4, pp. 693-9.
- Bramham, C. R. and E. Messaoudi. (2005), 'Bdnf Function in Adult Synaptic Plasticity: The Synaptic Consolidation Hypothesis', *Prog Neurobiol* Vol. 76, No. 2, pp. 99-125.

Braun, A. A., N. R. Herring, T. L. Schaefer, A. M. Hemmerle, J. W. Dickerson, K. B. Seroogy, C. V. Vorhees and M. T. Williams. (2011), 'Neurotoxic (+)-Methamphetamine Treatment in Rats Increases Brain-Derived Neurotrophic Factor and Tropomyosin Receptor Kinase B Expression in Multiple Brain Regions', *Neuroscience* Vol. 184, pp. 164-71.

Brietzke, E., L. Stertz, B. S. Fernandes, M. Kauer-Sant'anna, M. Mascarenhas, A. Escosteguy Vargas, J. A. Chies and F. Kapczinski. (2009), 'Comparison of Cytokine Levels in Depressed, Manic and Euthymic Patients with Bipolar Disorder', *J Affect Disord* Vol. 116, No. 3, pp. 214-7.

Cade, J. F. (2000), 'Lithium Salts in the Treatment of Psychotic Excitement. 1949', *Bull World Health Organ* Vol. 78, No. 4, pp. 518-20.

Calabrese, F., A. C. Rossetti, G. Racagni, P. Gass, M. A. Riva and R. Molteni. (2014), 'Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Bridge between Inflammation and Neuroplasticity', *Front Cell Neurosci* Vol. 8, pp. 430.

Calabrese, J. R., S. H. Fatemi and M. J. Woysville. (1996), 'Antidepressant Effects of Lamotrigine in Rapid Cycling Bipolar Disorder', *Am J Psychiatry* Vol. 153, No. 9, pp. 1236.

Can, A., T. G. Schulze and T. D. Gould. (2014), 'Molecular Actions and Clinical Pharmacogenetics of Lithium Therapy', *Pharmacol Biochem Behav* Vol. 123, pp. 3-16.

Canals, J. M., N. Checa, S. Marco, P. Akerud, A. Michels, E. Perez-Navarro, E. Tolosa, E. Arenas and J. Alberch. (2001), 'Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Cortical Neurons Is Regulated by Striatal Target Area', *J Neurosci* Vol. 21, No. 1, pp. 117-24.

Cherry, J. D., J. A. Olschowka and M. K. O'Banion. (2014), 'Neuroinflammation and M2 Microglia: The Good, the Bad, and the Inflamed', *J Neuroinflammation* Vol. 11, pp. 98.

Cheslack-Postava, K., S. Cremers, Y. Bao, L. Shen, C. A. Schaefer and A. S. Brown. (2016), 'Maternal Serum Cytokine Levels and Risk of Bipolar Disorder', *Brain Behav Immun.*

Choe, E. S., K. T. Chung, L. Mao and J. Q. Wang. (2002), 'Amphetamine Increases Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Transcription Factors in the Rat Striatum Via Group I Metabotropic Glutamate Receptors', *Neuropsychopharmacology* Vol. 27, No. 4, pp. 565-75.

Coppen, A., R. Noguera, J. Bailey, B. H. Burns, M. S. Swani, E. H. Hare, R. Gardner and R. Maggs. (1971), 'Prophylactic Lithium in Affective Disorders. Controlled Trial', *Lancet* Vol. 2, No. 7719, pp. 275-9.

Crump, C., K. Sundquist, M. A. Winkleby and J. Sundquist. (2013), 'Comorbidities and Mortality in Bipolar Disorder: A Swedish National Cohort Study', *JAMA Psychiatry* Vol. 70, No. 9, pp. 931-9.

Cunha, A. B., B. N. Frey, A. C. Andreazza, J. D. Goi, A. R. Rosa, C. A. Gonçalves, A. Santin and F. Kapczinski. (2006), 'Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Is Decreased in Bipolar Disorder During Depressive and Manic Episodes', *Neurosci Lett* Vol. 398, No. 3, pp. 215-9.

Dantzer, R., J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson and K. W. Kelley. (2008), 'From Inflammation to Sickness and Depression: When the Immune System Subjugates the Brain', *Nat Rev Neurosci* Vol. 9, No. 1, pp. 46-56.

Davies, C., D. J. Sanger, H. Steinberg, M. Tomkiewicz and D. C. U'Prichard. (1974), 'Lithium and Alpha-Methyl-P-Tyrosine Prevent "Manic" Activity in Rodents', *Psychopharmacologia* Vol. 36, No. 3, pp. 263-74.

de Oliveira, G. S., K. M. Cereser, B. S. Fernandes, M. Kauer-Sant'Anna, G. R. Fries, L. Stertz, B. Aguiar, B. Pfaffenseller and F. Kapczinski. (2009), 'Decreased Brain-Derived Neurotrophic Factor in Medicated and Drug-Free Bipolar Patients', *J Psychiatr Res* Vol. 43, No. 14, pp. 1171-4.

de Sousa, R. T., C. A. Zarate, Jr., M. V. Zanetti, A. C. Costa, L. L. Talib, W. F. Gattaz and R. Machado-Vieira. (2014), 'Oxidative Stress in Early Stage Bipolar Disorder and the Association with Response to Lithium', *J Psychiatr Res* Vol. 50, pp. 36-41.

de Souza, G. C., J. A. Gomes, A. I. de Gois Queiroz, M. M. de Araujo, L. M. Cavalcante, J. Machado Mde, A. S. Monte, D. F. de Lucena, J. Quevedo, A. F. Carvalho and D. Macedo. (2015), 'Preclinical Evidences for an Antimanic Effect of Carvedilol', *Neural Plast* Vol. 2015, pp. 692541.

de Souza Gomes, J. A., G. C. de Souza, M. Berk, L. M. Cavalcante, F. C. de Sousa, J. Budni, D. F. de Lucena, J. Quevedo, A. F. Carvalho and D. Macedo. (2015), 'Antimanic-Like Activity of Candesartan in Mice: Possible Involvement of Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neurotrophic Mechanisms', *Eur Neuropsychopharmacol* Vol. 25, No. 11, pp. 2086-97.

Einat, H. (2006), 'Modelling Facets of Mania--New Directions Related to the Notion of Endophenotypes', *J Psychopharmacol* Vol. 20, No. 5, pp. 714-22.

Engmann, B. (2011), 'Bipolar Affective Disorder and Parkinson's Disease', *Case Rep Med* Vol. 2011, pp. 154165.

Erickson, M. A. and W. A. Banks. (2011), 'Cytokine and Chemokine Responses in Serum and Brain after Single and Repeated Injections of Lipopolysaccharide: Multiplex Quantification with Path Analysis', *Brain Behav Immun* Vol. 25, No. 8, pp. 1637-48.

Feresten, A. H., V. Barakauskas, A. Ypsilanti, A. M. Barr and C. L. Beasley. (2013), 'Increased Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in Prefrontal Cortex in Psychotic Illness', *Schizophr Res* Vol. 150, No. 1, pp. 252-7.

Fiorino, D. F. and A. G. Phillips. (1999), 'Facilitation of Sexual Behavior and Enhanced Dopamine Efflux in the Nucleus Accumbens of Male Rats after D-Amphetamine-Induced Behavioral Sensitization', *J Neurosci* Vol. 19, No. 1, pp. 456-63.

Fleckenstein, A. E., T. J. Volz, E. L. Riddle, J. W. Gibb and G. R. Hanson. (2007), 'New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines', *Annu Rev Pharmacol Toxicol* Vol. 47, pp. 681-98.

Forty, L., A. Ulanova, L. Jones, I. Jones, K. Gordon-Smith, C. Fraser, A. Farmer, P. McGuffin, C. M. Lewis, G. M. Hosang, M. Rivera and N. Craddock. (2014), 'Comorbid Medical Illness in Bipolar Disorder', *Br J Psychiatry* Vol. 205, No. 6, pp. 465-72.

Franco, R. and D. Fernandez-Suarez. (2015), 'Alternatively Activated Microglia and Macrophages in the Central Nervous System', *Prog Neurobiol* Vol. 131, pp. 65-86.

Freeman, M. P. and S. A. Freeman. (2006), 'Lithium: Clinical Considerations in Internal Medicine', *Am J Med* Vol. 119, No. 6, pp. 478-81.

Frey, B. N., A. C. Andreazza, K. M. Ceresér, M. R. Martins, S. S. Valvassori, G. Z. Réus, J. Quevedo and F. Kapczinski. (2006a), 'Effects of Mood Stabilizers on

Hippocampus Bdnf Levels in an Animal Model of Mania', *Life Sci* Vol. 79, No. 3, pp. 281-6.

Frey, B. N., M. R. Martins, F. C. Petronilho, F. Dal-Pizzol, J. Quevedo and F. Kapczinski. (2006b), 'Increased Oxidative Stress after Repeated Amphetamine Exposure: Possible Relevance as a Model of Mania', *Bipolar Disord* Vol. 8, No. 3, pp. 275-80.

Frey, B. N., S. S. Valvassori, G. Z. Reus, M. R. Martins, F. C. Petronilho, K. Bardini, F. Dal-Pizzol, F. Kapczinski and J. Quevedo. (2006c), 'Changes in Antioxidant Defense Enzymes after D-Amphetamine Exposure: Implications as an Animal Model of Mania', *Neurochem Res* Vol. 31, No. 5, pp. 699-703.

Frey, B. N., S. S. Valvassori, G. Z. Réus, M. R. Martins, F. C. Petronilho, K. Bardini, F. Dal-Pizzol, F. Kapczinski and J. Quevedo. (2006d), 'Effects of Lithium and Valproate on Amphetamine-Induced Oxidative Stress Generation in an Animal Model of Mania', *J Psychiatry Neurosci* Vol. 31, No. 5, pp. 326-32.

Fukumoto, T., S. Morinobu, Y. Okamoto, A. Kagaya and S. Yamawaki. (2001), 'Chronic Lithium Treatment Increases the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Rat Brain', *Psychopharmacology (Berl)* Vol. 158, No. 1, pp. 100-6.

Ghadirian, A. M. and H. E. Lehmann. (1980), 'Neurological Side Effects of Lithium: Organic Brain Syndrome, Seizures, Extrapyrmidal Side Effects, and Eeg Changes', *Compr Psychiatry* Vol. 21, No. 5, pp. 327-35.

Goldsmith, D. R., M. H. Rapaport and B. J. Miller. (2016), 'A Meta-Analysis of Blood Cytokine Network Alterations in Psychiatric Patients: Comparisons between Schizophrenia, Bipolar Disorder and Depression', *Mol Psychiatry*.

Gomes, F., V. Tortelli and L. Diniz. (2013), 'Glía: Dos Velhos Conceitos Às Novas Funções De Hoje E as Que Ainda Virão', *Estudos avançados* Vol. 27, pp. 61-84.

Guloksuz, S., E. A. Cetin, T. Cetin, G. Deniz, E. T. Oral and D. J. Nutt. (2010), 'Cytokine Levels in Euthymic Bipolar Patients', *J Affect Disord* Vol. 126, No. 3, pp. 458-62.

Haarman, B. C., R. F. Riemersma-Van der Lek, J. C. de Groot, H. G. Ruhe, H. C. Klein, T. E. Zandstra, H. Burger, R. A. Schoevers, E. F. de Vries, H. A. Drexhage, W. A. Nolen and J. Doorduyn. (2014), 'Neuroinflammation in Bipolar Disorder - a [(11)C]-(R)-Pk11195 Positron Emission Tomography Study', *Brain Behav Immun* Vol. 40, pp. 219-25.

Hammacher, A., L. D. Ward, J. Weinstock, H. Treutlein, K. Yasukawa and R. J. Simpson. (1994), 'Structure-Function Analysis of Human Il-6: Identification of Two Distinct Regions That Are Important for Receptor Binding', *Protein Sci* Vol. 3, No. 12, pp. 2280-93.

Jiang, Y., N. Wei, J. Zhu, T. Lu, Z. Chen, G. Xu and X. Liu. (2010), 'Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor on Local Inflammation in Experimental Stroke of Rat', *Mediators Inflamm* Vol. 2010, pp. 372423.

Jung, Y. S., J. H. Park, H. Kim, S. Y. Kim, J. Y. Hwang, K. W. Hong, S. S. Bae, B. T. Choi, S. W. Lee and H. K. Shin. (2016), 'Probucol Inhibits Lps-Induced Microglia Activation and Ameliorates Brain Ischemic Injury in Normal and Hyperlipidemic Mice', *Acta Pharmacol Sin* Vol. 37, No. 8, pp. 1031-44.

Kalkman, H. O. and D. Feuerbach. (2016), 'Antidepressant Therapies Inhibit Inflammation and Microglial M1-Polarization', *Pharmacol Ther.*

Kapczinski, F., V. V. Dias, M. Kauer-Sant'Anna, B. N. Frey, R. Grassi-Oliveira, F. Colom and M. Berk. (2009), 'Clinical Implications of a Staging Model for Bipolar Disorders', *Expert Rev Neurother* Vol. 9, No. 7, pp. 957-66.

Kaplanski, J., A. Nassar, Y. Sharon-Granit, A. Jabareen, S. L. Kobal and A. N. Azab. (2014), 'Lithium Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Hypothermia in Rats', *Eur Rev Med Pharmacol Sci* Vol. 18, No. 12, pp. 1829-37.

Kauer-Sant'Anna, M., F. Kapczinski, A. C. Andreazza, D. J. Bond, R. W. Lam, L. T. Young and L. N. Yatham. (2009), 'Brain-Derived Neurotrophic Factor and Inflammatory Markers in Patients with Early- Vs. Late-Stage Bipolar Disorder', *Int J Neuropsychopharmacol* Vol. 12, No. 4, pp. 447-58.

Kim, Y. S., K. J. Lee and H. Kim. (2017), 'Serum Tumour Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Levels in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment', *Psychogeriatrics*.

Klanker, M., M. Feenstra and D. Denys. (2013), 'Dopaminergic Control of Cognitive Flexibility in Humans and Animals', *Front Neurosci* Vol. 7, pp. 201.

Kleinerman, E. S., R. D. Knowles, M. B. Blick and L. A. Zwelling. (1989), 'Lithium Chloride Stimulates Human Monocytes to Secrete Tumor Necrosis Factor/Cachectin', *J Leukoc Biol* Vol. 46, No. 5, pp. 484-92.

Kleinert, H., P. M. Schwarz and U. Forstermann. (2003), 'Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase', *Biol Chem* Vol. 384, No. 10-11, pp. 1343-64.

Kohler, C. A., T. H. Freitas, M. Maes, N. Q. de Andrade, C. S. Liu, B. S. Fernandes, B. Stubbs, M. Solmi, N. Veronese, N. Herrmann, C. L. Raison, B. J. Miller, K. L. Lancot

and A. F. Carvalho. (2017), 'Peripheral Cytokine and Chemokine Alterations in Depression: A Meta-Analysis of 82 Studies', *Acta Psychiatr Scand*.

Kolar, D., A. Keller, M. Golfinopoulos, L. Cumyn, C. Syer and L. Hechtman. (2008), 'Treatment of Adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder', *Neuropsychiatr Dis Treat* Vol. 4, No. 1, pp. 107-21.

Koo, J. W. and R. S. Duman. (2008), 'Il-1beta Is an Essential Mediator of the Antineurogenic and Anhedonic Effects of Stress', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 105, No. 2, pp. 751-6.

Krasnova, I. N., M. Chiflikyan, Z. Justinova, M. T. McCoy, B. Ladenheim, S. Jayanthi, C. Quintero, C. Brannock, C. Barnes, J. E. Adair, E. Lehrmann, F. H. Kobeissy, M. S. Gold, K. G. Becker, S. R. Goldberg and J. L. Cadet. (2013), 'Creb Phosphorylation Regulates Striatal Transcriptional Responses in the Self-Administration Model of Methamphetamine Addiction in the Rat', *Neurobiol Dis* Vol. 58, pp. 132-43.

Lawrence, T. (2009), 'The Nuclear Factor Nf-Kappab Pathway in Inflammation', *Cold Spring Harb Perspect Biol* Vol. 1, No. 6, pp. a001651.

Leboyer, M., J. Oliveira, R. Tamouza and L. Groc. (2016), 'Is It Time for Immunopsychiatry in Psychotic Disorders?', *Psychopharmacology (Berl)* Vol. 233, No. 9, pp. 1651-60.

Lenox, R. H. and L. Wang. (2003), 'Molecular Basis of Lithium Action: Integration of Lithium-Responsive Signaling and Gene Expression Networks', *Mol Psychiatry* Vol. 8, No. 2, pp. 135-44.

Lu, B., P. T. Pang and N. H. Woo. (2005), 'The Yin and Yang of Neurotrophin Action', *Nat Rev Neurosci* Vol. 6, No. 8, pp. 603-14.

Machado-Vieira, R., F. Kapczinski and J. C. Soares. (2004), 'Perspectives for the Development of Animal Models of Bipolar Disorder', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* Vol. 28, No. 2, pp. 209-24.

Macêdo, D. S., D. F. de Lucena, A. I. Queiroz, R. C. Cordeiro, M. M. Araújo, F. C. Sousa, S. M. Vasconcelos, T. N. Hyphantis, J. Quevedo, R. S. McIntyre and A. F. Carvalho. (2013), 'Effects of Lithium on Oxidative Stress and Behavioral Alterations Induced by Lisdexamfetamine Dimesylate: Relevance as an Animal Model of Mania', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* Vol. 43, pp. 230-7.

Makhatadze, N. J. (1998), 'Tumor Necrosis Factor Locus: Genetic Organisation and Biological Implications', *Hum Immunol* Vol. 59, No. 9, pp. 571-9.

Malhi, G. S., M. Tanious, P. Das, C. M. Coulston and M. Berk. (2013), 'Potential Mechanisms of Action of Lithium in Bipolar Disorder. Current Understanding', *CNS Drugs* Vol. 27, No. 2, pp. 135-53.

Martinez-Serrano, A. and A. Bjorklund. (1996), 'Protection of the Neostriatum against Excitotoxic Damage by Neurotrophin-Producing, Genetically Modified Neural Stem Cells', *J Neurosci* Vol. 16, No. 15, pp. 4604-16.

Mayr, B. and M. Montminy. (2001), 'Transcriptional Regulation by the Phosphorylation-Dependent Factor Creb', *Nat Rev Mol Cell Biol* Vol. 2, No. 8, pp. 599-609.

McFadden, L. M., P. L. Vieira-Brock, G. R. Hanson and A. E. Fleckenstein. (2014), 'Methamphetamine Self-Administration Attenuates Hippocampal Serotonergic Deficits: Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor', *Int J Neuropsychopharmacol* Vol. 17, No. 8, pp. 1315-20.

Medzhitov, R. (2008), 'Origin and Physiological Roles of Inflammation', *Nature* Vol. 454, No. 7203, pp. 428-35.

Meredith, G. E., S. Callen and D. A. Scheuer. (2002), 'Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression Is Increased in the Rat Amygdala, Piriform Cortex and Hypothalamus Following Repeated Amphetamine Administration', *Brain Res* Vol. 949, No. 1-2, pp. 218-27.

Mitchell, P. B. and D. Hadzi-Pavlovic. (2000), 'Lithium Treatment for Bipolar Disorder', *Bull World Health Organ* Vol. 78, No. 4, pp. 515-7.

Modabbernia, A., S. Taslimi, E. Brietzke and M. Ashrafi. (2013), 'Cytokine Alterations in Bipolar Disorder: A Meta-Analysis of 30 Studies', *Biol Psychiatry* Vol. 74, No. 1, pp. 15-25.

Montgomery, S. L. and W. J. Bowers. (2012), 'Tumor Necrosis Factor-Alpha and the Roles It Plays in Homeostatic and Degenerative Processes within the Central Nervous System', *J Neuroimmune Pharmacol* Vol. 7, No. 1, pp. 42-59.

Moraes, M. M., M. C. Galvao, D. Cabral, C. P. Coelho, N. Queiroz-Hazarbassanov, M. F. Martins, E. F. Bondan, M. M. Bernardi and T. B. Kirsten. (2017), 'Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats Via Neuroinflammatory Pathway', *PLoS One* Vol. 12, No. 1, pp. e0169446.

Moreno, D. H. and R. A. Moreno. (2005), 'Estados Mistos E Quadros De Ciclagem

Rápida No Transtorno Bipolar', *Rev Psiq Clín* Vol. 32, No. 1, pp. 56-62.

Murer, M. G., Q. Yan and R. Raisman-Vozari. (2001), 'Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Control Human Brain, and in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease', *Prog Neurobiol* Vol. 63, No. 1, pp. 71-124.

Murray, P. J., J. E. Allen, S. K. Biswas, E. A. Fisher, D. W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J. A. Hamilton, L. B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F. O. Martinez, J. L. Mege, D. M. Mosser, G. Natoli, J. P. Saeij, J. L. Schultze, K. A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J. A. van Ginderachter, S. N. Vogel and T. A. Wynn. (2014), 'Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines', *Immunity* Vol. 41, No. 1, pp. 14-20.

Naaldijk, Y. M., M. C. Bittencourt, U. Sack and H. Ulrich. (2016), 'Kinins and Microglial Responses in Bipolar Disorder: A Neuroinflammation Hypothesis', *Biol Chem* Vol. 397, No. 4, pp. 283-96.

Nahman, S., R. H. Belmaker and A. N. Azab. (2012), 'Effects of Lithium on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Rat Primary Glia Cells', *Innate Immun* Vol. 18, No. 3, pp. 447-58.

Nakagawa, Y. and K. Chiba. (2015), 'Diversity and Plasticity of Microglial Cells in Psychiatric and Neurological Disorders', *Pharmacol Ther* Vol. 154, pp. 21-35.

Nassar, A. and A. N. Azab. (2014), 'Effects of Lithium on Inflammation', *ACS Chem Neurosci* Vol. 5, No. 6, pp. 451-8.

Ortiz-Domínguez, A., M. E. Hernández, C. Berlanga, D. Gutiérrez-Mora, J. Moreno, G. Heinze and L. Pavón. (2007), 'Immune Variations in Bipolar Disorder: Phasic Differences', *Bipolar Disord* Vol. 9, No. 6, pp. 596-602.

Parry, G. C. and N. Mackman. (1997), 'Role of Cyclic Amp Response Element-Binding Protein in Cyclic Amp Inhibition of Nf-KappaB-Mediated Transcription', *J Immunol* Vol. 159, No. 11, pp. 5450-6.

Passos, I. C., M. P. Vasconcelos-Moreno, L. G. Costa, M. Kunz, E. Brietzke, J. Quevedo, G. Salum, P. V. Magalhães, F. Kapczinski and M. Kauer-Sant'Anna. (2015), 'Inflammatory Markers in Post-Traumatic Stress Disorder: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression', *Lancet Psychiatry* Vol. 2, No. 11, pp. 1002-12.

Perez-Navarro, E., A. M. Canudas, P. Akerund, J. Alberch and E. Arenas. (2000), 'Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3, and Neurotrophin-4/5 Prevent the Death of Striatal Projection Neurons in a Rodent Model of Huntington's Disease', *J Neurochem* Vol. 75, No. 5, pp. 2190-9.

Post, R. M. (2007), 'Role of Bdnf in Bipolar and Unipolar Disorder: Clinical and Theoretical Implications', *J Psychiatr Res* Vol. 41, No. 12, pp. 979-90.

Prien, R. F., E. M. Caffey, Jr. and C. J. Klett. (1973), 'Prophylactic Efficacy of Lithium Carbonate in Manic-Depressive Illness. Report of the Veterans Administration and National Institute of Mental Health Collaborative Study Group', *Arch Gen Psychiatry* Vol. 28, No. 3, pp. 337-41.

Raivich, G., M. Bohatschek, C. U. Kloss, A. Werner, L. L. Jones and G. W. Kreutzberg. (1999), 'Neuroglial Activation Repertoire in the Injured Brain: Graded Response,

Molecular Mechanisms and Cues to Physiological Function', *Brain Res Brain Res Rev* Vol. 30, No. 1, pp. 77-105.

Rao, J. S., G. J. Harry, S. I. Rapoport and H. W. Kim. (2010), 'Increased Excitotoxicity and Neuroinflammatory Markers in Postmortem Frontal Cortex from Bipolar Disorder Patients', *Mol Psychiatry* Vol. 15, No. 4, pp. 384-92.

Ren, W., J. Tao, Y. Wei, H. Su, J. Zhang, Y. Xie, J. Guo, X. Zhang, H. Zhang and J. He. (2016), 'Time-Dependent Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Decline During Methamphetamine Withdrawal', *Medicine (Baltimore)* Vol. 95, No. 5.

Rosenblat, J. D. and R. S. McIntyre. (2016), 'Bipolar Disorder and Inflammation', *Psychiatr Clin North Am* Vol. 39, No. 1, pp. 125-37.

Rowley, H. L., R. Kulkarni, J. Gosden, R. Brammer, D. Hackett and D. J. Heal. (2012), 'Lisdexamfetamine and Immediate Release D-Amphetamine - Differences in Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationships Revealed by Striatal Microdialysis in Freely-Moving Rats with Simultaneous Determination of Plasma Drug Concentrations and Locomotor Activity', *Neuropharmacology* Vol. 63, No. 6, pp. 1064-74.

Sachs, G. S., D. J. Printz, D. A. Kahn, D. Carpenter and J. P. Docherty. (2000), 'The Expert Consensus Guideline Series: Medication Treatment of Bipolar Disorder 2000', *Postgrad Med* Vol. Spec No, pp. 1-104.

Saha, R. N. and K. Pahan. (2006), 'Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Glial Cells', *Antioxid Redox Signal* Vol. 8, No. 5-6, pp. 929-47.

Saraiva, M. and A. O'Garra. (2010), 'The Regulation of Il-10 Production by Immune Cells', *Nat Rev Immunol* Vol. 10, No. 3, pp. 170-81.

Saunders, K. E. and J. R. Geddes. (2016), 'The Management of Bipolar Disorder', *Br J Hosp Med (Lond)* Vol. 77, No. 3, pp. 175-9.

Schaff, M. R., J. Fawcett and J. M. Zajecka. (1993), 'Divalproex Sodium in the Treatment of Refractory Affective Disorders', *J Clin Psychiatry* Vol. 54, No. 10, pp. 380-4.

Schou, M., N. Juel-Nielsen, E. Stromgren and H. Voldby. (1954), 'The Treatment of Manic Psychoses by the Administration of Lithium Salts', *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Vol. 17, No. 4, pp. 250-60.

Shaltiel, G., G. Chen and H. K. Manji. (2007), 'Neurotrophic Signaling Cascades in the Pathophysiology and Treatment of Bipolar Disorder', *Curr Opin Pharmacol* Vol. 7, No. 1, pp. 22-6.

Shi, X. and J. F. McGinty. (2007), 'Repeated Amphetamine Treatment Increases Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase, Protein Kinase B, and Cyclase Response Element-Binding Protein in the Rat Striatum', *J Neurochem* Vol. 103, No. 2, pp. 706-13.

Shim, I. H., Y. S. Woo, T. Y. Jun and W. M. Bahk. (2014), 'Mixed-State Bipolar I and II Depression: Time to Remission and Clinical Characteristics', *J Affect Disord* Vol. 152-154, pp. 340-6.

Small, J. G., M. H. Klapper, J. D. Marhenke, V. Milstein, G. C. Woodham and J. J. Kellams. (1995), 'Lithium Combined with Carbamazepine or Haloperidol in the Treatment of Mania', *Psychopharmacol Bull* Vol. 31, No. 2, pp. 265-72.

Soeiro-de-Souza, M. G., V. V. Dias, M. L. Figueira, O. V. Forlenza, W. F. Gattaz, C. A. Zarate, Jr. and R. Machado-Vieira. (2012), 'Translating Neurotrophic and Cellular Plasticity: From Pathophysiology to Improved Therapeutics for Bipolar Disorder', *Acta Psychiatr Scand* Vol. 126, No. 5, pp. 332-41.

Souza, F. G. d. M. (2005), 'Tratamento Do Transtorno Bipolar - Eutimia', *Rev. Psiquiatr. Vol. 32, No. 1, pp. 63-70.*

Suppes, T. and E. B. Dennehy. (2009), *Transtorno Bipolar: As Mais Recentes Estratégias De Avaliação E Tratamento*. Artmed.

Tao, X., S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz and M. E. Greenberg. (1998), 'Ca²⁺ Influx Regulates Bdnf Transcription by a Creb Family Transcription Factor-Dependent Mechanism', *Neuron* Vol. 20, No. 4, pp. 709-26.

Tondo, L., K. R. Jamison and R. J. Baldessarini. (1997), 'Effect of Lithium Maintenance on Suicidal Behavior in Major Mood Disorders', *Ann N Y Acad Sci* Vol. 836, pp. 339-51.

Torrent, C., B. Amann, J. Sanchez-Moreno, F. Colom, M. Reinares, M. Comes, A. R. Rosa, J. Scott and E. Vieta. (2008), 'Weight Gain in Bipolar Disorder: Pharmacological Treatment as a Contributing Factor', *Acta Psychiatr Scand* Vol. 118, No. 1, pp. 4-18.

Tunca, Z., A. Ozerdem, D. Ceylan, Y. Yalcin, G. Can, H. Resmi, P. Akan, G. Ergor, O. Aydemir, C. Cengisiz and D. Kerim. (2014), 'Alterations in Bdnf (Brain Derived Neurotrophic Factor) and Gdnf (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) Serum Levels in Bipolar Disorder: The Role of Lithium', *J Affect Disord* Vol. 166, pp. 193-200.

Valvassori, S. S., P. T. Tonin, R. B. Varela, A. F. Carvalho, E. Mariot, R. T. Amboni, G. Bianchini, M. L. Andersen and J. Quevedo. (2015), 'Lithium Modulates the Production of Peripheral and Cerebral Cytokines in an Animal Model of Mania Induced by Dextroamphetamine', *Bipolar Disord* Vol. 17, No. 5, pp. 507-17.

van den Ameele, S., L. van Diermen, W. Staels, V. Coppens, G. Dumont, B. Sabbe and M. Morrens. (2016), 'The Effect of Mood-Stabilizing Drugs on Cytokine Levels in Bipolar Disorder: A Systematic Review', *J Affect Disord* Vol. 203, pp. 364-73.

Van Gerpen, J. A. (2002), 'Drug-Induced Parkinsonism', *Neurologist* Vol. 8, No. 6, pp. 363-70.

Wang, H. M., T. Zhang, Q. Li, J. K. Huang, R. F. Chen and X. J. Sun. (2013), 'Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3beta by Lithium Chloride Suppresses 6-Hydroxydopamine-Induced Inflammatory Response in Primary Cultured Astrocytes', *Neurochem Int* Vol. 63, No. 5, pp. 345-53.

Wang, M. J., H. Y. Huang, W. F. Chen, H. F. Chang and J. S. Kuo. (2010), 'Glycogen Synthase Kinase-3beta Inactivation Inhibits Tumor Necrosis Factor-Alpha Production in Microglia by Modulating Nuclear Factor Kappab and Mlk3/Jnk Signaling Cascades', *J Neuroinflammation* Vol. 7, pp. 99.

Weitz, T. M. and T. Town. (2012), 'Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context', *Int J Alzheimers Dis* Vol. 2012, pp. 314185.

Wen, A. Y., K. M. Sakamoto and L. S. Miller. (2010), 'The Role of the Transcription Factor Creb in Immune Function', *J Immunol* Vol. 185, No. 11, pp. 6413-9.

Yatham, L. N., S. H. Kennedy, S. V. Parikh, A. Schaffer, S. Beaulieu, M. Alda, C. O'Donovan, G. Macqueen, R. S. McIntyre, V. Sharma, A. Ravindran, L. T. Young, R. Milev, D. J. Bond, B. N. Frey, B. I. Goldstein, B. Lafer, B. Birmaher, K. Ha, W. A. Nolen and M. Berk. (2013), 'Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (Canmat) and International Society for Bipolar Disorders (Isbd) Collaborative Update of Canmat Guidelines for the Management of Patients with Bipolar Disorder: Update 2013', *Bipolar Disord* Vol. 15, No. 1, pp. 1-44.

Yuskaitis, C. J. and R. S. Jope. (2009), 'Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Microglial Migration, Inflammation, and Inflammation-Induced Neurotoxicity', *Cell Signal* Vol. 21, No. 2, pp. 264-73.

Zung, S., L. Michelon and Q. Cordeiro. (2010), 'O Uso Do Lítio No Transtorno Afetivo Bipolar', *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo* Vol. 55, No. 1, pp. 30-7.

ANEXO A

Carta de aprovação do projeto sob número 150538 pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA).



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 150538

Data da Versão do Projeto: 09/11/2015

Pesquisadores:

MARCIA KAUER SANT ANNA

GIOVANA BRISTOT

LUIZA PAUL GÉA

BRUNA MARIA ASCOLI

Título: Efeitos do lítio em parâmetros gliais e inflamatórios em um modelo animal de mania.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 30 de dezembro de 2015.

Biol. Michael Everton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA

ANEXO B

Instruções para a submissão de manuscritos na revista Journal of Psychiatric Research.



TABLE OF CONTENTS

| | | |
|---|---------------------------------|------------|
| ● | Description | p.1 |
| ● | Audience | p.1 |
| ● | Impact Factor | p.1 |
| ● | Abstracting and Indexing | p.2 |
| ● | Editorial Board | p.2 |
| ● | Guide for Authors | p.4 |



ISSN: 0022-3956

DESCRIPTION

Founded in 1961 to report on the latest work in **psychiatry** and **cognate** disciplines, the *Journal of Psychiatric Research* is dedicated to innovative and timely studies of four important areas of research:

- (1) Clinical studies of all disciplines relating to **psychiatric illness**, as well as normal **human behaviour**, including biochemical, physiological, genetic, environmental, social, psychological and epidemiological factors;
- (2) Basic studies pertaining to psychiatry in such fields as **neuropsychopharmacology**, **neuroendocrinology**, **electrophysiology**, **genetics**, **experimental psychology** and **epidemiology**;
- (3) The growing application of clinical laboratory techniques in psychiatry, including **imagery** and **spectroscopy** of the brain, molecular biology and computer sciences;
- (4) Advances in basic and clinical research methodology, including the process of "bench-to-bedside" transfer of new research findings.

The Editors-in-Chief will accept papers of high scientific caliber, if necessary after appropriate revision, and will aim for their rapid publication. In addition, the Journal will be enhanced by the inclusion of commissioned reviews, news items, book notices and letters to the [Editors](#).

AUDIENCE

Basic and clinical researchers in psychiatry.

IMPACT FACTOR

2015: 4.465 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Chemical Abstracts
Current Contents/Clinical Medicine
Current Contents/Life Sciences
Current Contents/SciSearch Database
Current Contents/Science Citation Index
Current Contents/Social & Behavioral Sciences
BIOMED
MEDLINE®
LLBA
EMBASE
PsycLIT CD-ROM
Psychology Abstracts
Research Alert
PsycINFO
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

Florian Holsboer, Max Planck Institut (MPI) für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2 - 10, D-80804, München, Germany

Alan Schatzberg, Dept. of Psychiatry & Behav. Sci., Stanford University School of Medicine, 401 Quarry Road, Stanford, California, CA 94305-5117, USA

Assistant Editors

Charles DeBattista, Dept. of Psychiatry, Stanford University, 401 Quarry Road, Stanford, California, CA 94305-5723, USA

Marcus Ising, Max Planck Institut (MPI) für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2 - 10, D-80804, München, Germany

Maurice Ohayon, Sleep Epidemiology, School of Medicine, Stanford University, 3430 West Bayshore Road, Stanford, California, CA 94303, USA

Managing Editors

Anna-Maria Proebstl, Munich, Germany

Rebecca Wyse, Stanford, California, USA

Editorial Board

D.H. Abbott, Madison, Wisconsin, USA

H. Akil, Ann Arbor, Michigan, USA

R.H. Belmaker, Beer Sheva, Israel

M. Berger, Freiburg, Germany

D.L. Braff, San Diego, CA, USA

W.E. Bunney, Irvine, CA, USA

E. Coccaro, Chicago, Illinois, USA

J.T. Coyle, Belmont, Massachusetts, USA

R. de Kloet, Leiden, The Netherlands

D.L. Dunner, Mercer Island, Washington, USA

E. Frank, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

J.E. Grant, Minneapolis, MN, USA

A. Halaris, Maywood, Illinois, USA

K.A. Halmi, White Plains, New York, USA

P.D. Harvey, Miami, Florida, USA

I. Heuser, Berlin, Germany

T. Higuchi, Ichikawa, Japan

E. Holsboer-Trachsler, Basel, Switzerland

M. Joels, Utrecht, Netherlands

L.L. Judd, La Jolla, California, USA

F. Kapczinski, Porto Alegre, Brazil

T.A. Ketter, Stanford, California, USA

H.C. Kraemer, Stanford, California, USA

J.C. Krieg, Marburg, Germany

H. Kunugi, Tokyo, Japan
S. Kutcher, Halifax, Nova Scotia, Canada
J. A. Lieberman, New York, New York, USA
W. Maier, Bonn, Germany
A.A. Mathé, Stockholm, Sweden
C.B. Nemeroff, Miami, Florida, USA
R. O'Hara, Stanford, California, USA
F. Ohl, Utrecht, The Netherlands
R.M. Post, Bethesda, MD, USA
J.L. Rapoport, Bethesda, Maryland, USA
A.L. Reiss, Stanford, California, USA
R. Rupprecht, Regensburg, Germany
A.J. Rush, Singapore
C. Sandi, Lausanne, Switzerland
M.A. Schuckit, San Diego, California, USA
E. Seifritz, Zürich, Switzerland
L.J. Siever, New York, New York, USA
M.E. Thase, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
M. H. Trivedi, Dallas, Texas, USA
S.J. Watson, Ann Arbor, Michigan, USA
H.G.M. Westenberg, Utrecht, The Netherlands
R. Yehuda, New York, New York, USA
M. Zimmerman, Providence, Rhode Island, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Description

Founded in 1961 to report on the latest work in psychiatry and cognate disciplines, the Journal of Psychiatric Research is dedicated to innovative and timely studies of four important areas of research:

- (1) clinical and translational studies of all disciplines relating to psychiatric illness, as well as normal human behaviour, including biochemical, physiological, genetic, environmental, social, psychological and epidemiological factors;
- (2) basic studies pertaining to psychiatry in such fields as neuropsychopharmacology, neuroendocrinology, electrophysiology, genetics, experimental psychology and epidemiology;
- (3) the growing application of clinical laboratory techniques in psychiatry, including imagery and spectroscopy of the brain, molecular biology and computer sciences;
- (4) advances in basic and clinical research methodology, including the process of "bench-to-bedside" transfer of new research findings.

The Editors-in-Chief will accept papers of high scientific caliber, after appropriate revision, if necessary, and will aim for their rapid publication. In addition, the Journal will be enhanced by the inclusion of commissioned reviews, news items, book notices and letters to the Editors.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Submissions types and word limits

Journal of Psychiatric Research considers four types of manuscripts for possible publication:

1. Original articles: Original articles are limited to 4,000 words in the text body, excluding abstract, references, figure legends, acknowledgement and disclosures.
2. Short communications: Short communications are brief reports on preliminary new findings limited to 15,000 characters (including blanks). Authors may include up to 4 figures and up to 2 tables.
3. Review articles: Review articles should not exceed 6,000 words.

4. Letters to the Editor: Letters to the Editor may be considered for publication if they include important general comments or comments on a previous paper or letter in the Journal. The title of the letter should begin with "Letter to the Editor: " or, in the case of a reply to a previous letter, with "Reply to ". The text does not include an abstract and is limited to 1,000 words. One figure or one table may be included.

Queries

Authors may send queries concerning the submission process or journal procedures to the appropriate editorial office. Corresponding authors from the United States, Canada or Latin America may contact Rebecca Wyse at rwyse@stanford.edu. Authors from all other countries may contact Mrs. Anna-Maria Proebstl at jpr@mpipsykl.mpg.de.

For further details on how to submit online, please visit www.elsevier.com/submissionsupport

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Ethical Considerations

Authors of reports on human studies, especially those involving placebo, symptom provocation, drug discontinuation, or patients with disorders that may impair decision-making capability, should consider the ethical issues related to the work presented and include (in the Methods and Materials section of their manuscript) detailed information on the informed consent process, including the method or methods used to assess the subject's capacity to give informed consent, and safeguards included in the study design for protection of human subjects. Specifically, authors should consider all ethical issues relevant to their research, and briefly address each of these in their reports. When relevant patient follow-up data are available, this should also be reported. Specifically, investigators reporting on research involving human subjects or animals must have prior approval from an institutional review board. This approval should be mentioned in the methods section of the manuscript. In countries where institutional review boards are not available; the authors must include a statement that research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised 1989. All studies involving animals must state that the authors followed the guidelines for the use and care of laboratory animals of the author's institution or the National Research Council or any national law pertaining to animal research care.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason

for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

[More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).

- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via https://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=JPSYCHIATRRES

Review Process

Papers, except invited reviews, will be evaluated by at least two external experts. The authors are invited to propose four potential referees, including their names, affiliations, and institution-based E-mail addresses. However, the Editors will exclusively make the choice of reviewers. The authors will be notified as soon as possible whether a contribution is accepted for publication in the form that it was submitted, acceptable after a revision (which, in general, will be reviewed again), or rejected.

PREPARATION

Article structure

Required Submission Files

When submitting a manuscript to Journal of Psychiatric Research online, authors will receive the following prompts: select article type; enter title; add/edit/remove authors; submit abstract; enter keywords; select classifications; suggest reviewers; request editor; and attach files.

Once the preliminary submission fields have been completed, authors will be asked to upload the documents listed below as separate files. The first six: acknowledgement, conflict of interest, contributors, cover letter, manuscript, and role of the funding source are mandatory and starred (*); the remaining four: figure(s), supplementary material, table(s) and video still are optional.

Please note the following: Do not include the required author disclosures, conflict of interest, contributors, and role of funding source in the main manuscript, only as separate, uploaded files. Furthermore, please note that the title, abstract, and keywords are entered in their appropriate fields within the submission system AND within the beginning pages of the manuscript file.

Cover Letter

The cover letter should briefly explain the uniqueness of the submitted work or summarize the improvements in case of a revised manuscript. For revisions, please include an additional letter that includes point-by-point responses to all Editor and/or Reviewer concerns.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

Please include an abstract of no more than 250 words in single paragraph format.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide detailed information regarding the study population investigated and methods used. Thoroughly explain statistical procedures.

For studies reporting results obtained in humans, include a statement that 1) the investigation was carried out in accordance with the latest version of the Declaration of Helsinki, 2) the study design was reviewed by an appropriate ethical committee, and 3) informed consent of the participants was obtained after the nature of the procedures had been fully explained.

For studies reporting experiments on animals, include a statement that researchers followed relevant institutional and national guidelines for both the care and use of laboratory animals.

Results

Results of the study may be represented in tables or figures, as authors deem appropriate. However, do not duplicate presentation (e.g. do not repeat numerical data from tables in the text). It is not appropriate to present means or medians exclusively; please also provide measures of values distribution.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Discussion of study results should be placed within the appropriate context of knowledge and include discussion of study limitations and implications for future work.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.

- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Tables are to be uploaded, numbered consecutively with Arabic numbers. Each table should include a header. Do not use vertical bars. For every variable, the units of measurement should be clearly identified.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their

article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-psychiatric-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material(E-Components)

Supplementary material(e-components) can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material

together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Transparency

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. If you submit [this form](#) with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

3D neuroimaging

You can enrich your online articles by providing 3D neuroimaging data in NIFTI format. This will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available neuroimaging datasets; zoom, rotate and pan the 3D brain

reconstruction; cut through the volume; change opacity and color mapping; switch between 3D and 2D projected views; and download the data. The viewer supports both single (.nii) and dual (.hdr and .img) NIfTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is maximum 150 MB. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D neuroimaging data' submission category. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for downloading from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead. [More information](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>