

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

**CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO  
SISTEMA PURINÉRGICO NO TRANSTORNO BIPOLAR**

**CAROLINA DE MOURA GUBERT**

Porto Alegre

2018

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

**CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO  
SISTEMA PURINÉRGICO NO TRANSTORNO BIPOLAR**

**CAROLINA DE MOURA GUBERT**

Orientadora: **Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini**

Co-orientador: **Prof. Dr. Pedro Vieira da Silva Magalhães**

Tese 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 Doutora em Bioquímica.

Porto Alegre

2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Gubert, Carolina de Moura

Caracterização do envolvimento do sistema purinérgico no transtorno bipolar / Carolina de Moura Gubert. -- 2018.

180 f.

Orientadora: Ana Maria Oliveira Battastini.

Coorientador: Pedro Vieira da Silva Magalhães.

Tese (Doutorado) -- 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, 2018.

1. transtorno bipolar . 2. sistema purinérgico.  
3. P2X7R. 4. mania. 5. lítio. I. Battastini, Ana Maria Oliveira, orient. II. Magalhães, Pedro Vieira da Silva, coorient. III. Título.

*“Time will pass; this mood will pass; and I will, eventually, be myself again. But then, at some unknown time, the electrifying carnival will come back into my mind.”*  
(Jamison, 1996, p.188).

*Dedico esta tese a todos os pacientes psiquiátricos;  
à memória e ao futuro.*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Ana Battastini, obrigada pela confiança, generosidade e carinho que me permitiram anos de muito aprendizado, crescimento e liberdade. Admiro muito a Professora, pesquisadora e mãe científica que és, sempre será uma inspiração;

Ao Professor Pedro Magalhães por sempre ter acreditado em mim e no meu potencial, agradeço a co-orientação;

Ao Professor Flávio Kapczinski, por ter me iniciado na ciência, ter me proporcionado tantas oportunidades e formação. Agradeço ainda o todo o suporte e incentivo que ainda me proporciona;

À Roberta, meu braço direito, minha consciência, meu superego, minha principal motivadora. Obrigada por ter tornado todos esses experimentos e momentos de laboratório os melhores. Para onde eu for, te quero sempre comigo;

Ao laboratório 22 pelo incrível ambiente de trabalho. Tenho que agradecer todas as conformações que vivi, onde levo amigos incríveis: Fran, Elisinha, Angel, Leti, Fabrício, Fabi, Amandinha, Andressa, Cezinha, Chica, Ju, Mery, Dani, Thaís e Milla. Em especial Robertinha e Lila que sempre foram além do dia-a-dia de bancada, direto para o meu coração;

Ao laboratório de Psiquiatria Molecular que me gerou tantos trabalhos quanto amigos verdadeiros, em especial Maurício, Pâmela, Eduarda, Luiza, Pani e Gabriel. Levo vocês comigo sempre;

Aos Professores Fábio Klamt, Fernanda Morrone e Robson Coutinho que de maneira muito espontânea e particular me motivaram à carreira científica;

Aos meus alicerces, maiores incentivadores e admiradores, a minha família. Em especial aos meus pais pela inspiração. Aos meus avós pelo apoio incondicional. Aos meus tios e primos pela motivação e em especial à Cris, que sempre me proporcionou tudo isso com um acréscimo de amor de irmã. Amo todos imensamente;

Ao Lê pelo apoio e carinho de sempre e à família Todeschini pela motivação;

À Julinha, Isa e Lê por serem meu porto seguro;

Ao Rafa pelo suporte, amor e leveza. Obrigada por ter tornado imensamente agradável o final desta etapa;

À dança e a Donz por ter completado um vazio em mim, preenchendo de amigos e incríveis estados de *flow*;

Aos Departamento de Bioquímica e seus funcionários pelas condições de trabalho e ambiente único que proporcionaram. Em especial Cléia, Claudinha, Giordano e Silvana;

Aos funcionários da UEA do HCPA, em especial a Marta, sempre solícita;

Aos financiadores de tudo CNPq, CAPES, FIPE e UFRGS.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em três **Partes**, cada uma sendo constituída dos seguintes itens:

**Parte I:** Resumo, Resumo em inglês (Abstract), Lista de abreviações, Introdução e Objetivos;

**Parte II:** Resultados, que estão divididos em capítulos, de 1 a 4;

**Parte III:** Discussão, Conclusão, Referências bibliográficas citadas na Introdução da Parte I e Discussão da Parte III e Anexos

Os trabalhos elaborados nesta tese foram desenvolvidos no laboratório de Sinalização Purinérgica, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob a orientação da Dra. Ana Maria Oliveira Battastini, como também no Laboratório de Psiquiatria Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob a orientação do Dr. Pedro Vieira da Silva Magalhães.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	VI
PARTE I.....	9
Resumo.....	10
Abstract .....	11
Lista de abreviaturas .....	12
Lista de figuras .....	14
1. Introdução .....	15
1.1. Transtorno Bipolar .....	15
1.2. Impacto cognitivo e de funcionalidade do Transtorno Bipolar .....	18
1.3. Etiologia do Transtorno Bipolar .....	19
1.4. Neurobiologia do Transtorno Bipolar .....	21
1.5. Tratamento Farmacológico para o Transtorno Bipolar .....	23
1.6. Modelo animal de mania .....	24
2. Sistema purinérgico.....	26
2.1. Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares .....	27
2.2. Ectonucleotidases .....	29
2.3. Purinoreceptores.....	33
2.4. Receptor Purinérgico P2X7.....	35
3. P2X7R e Transtorno Bipolar .....	39
Objetivo.....	41
Objetivos específicos .....	41
PARTE II .....	42
Capítulo 1 .....	43
Peripheral adenosine levels in euthymic patients with bipolar disorder .....	43
Capítulo 2.....	50
Bipolar Disorder and the 1513A>C P2RX7 polymorphism frequency.....	50
Capítulo 3.....	72
P2X7 receptor as a new therapeutic target in acute mania: a preclinical study.....	72

Capítulo 4.....	99
Análise da ação neuroprotetora do lítio frente à modulação purinérgica em linhagens neuronal e microglial.....	99
PARTE III.....	126
Discussão.....	127
Conclusão.....	147
Perspectivas.....	148
Referências.....	149
Anexo I.....	179
Artigos científicos publicados em co-autoria durante o período do doutorado.....	179

## **PARTE I**

## Resumo

O Transtorno Bipolar é uma doença crônica e grave que apresenta curso episódico e alto impacto sobre a funcionalidade do paciente. Possui potencial para alto grau de severidade, recorrência e intensidade e estima-se que sua prevalência ao longo da vida seja de 2,4% da população mundial. A fisiopatologia deste transtorno ainda não é bem compreendida e ainda o fármaco de primeira escolha é o lítio, embora tampouco seja claro seu mecanismo de ação. O sistema purinérgico principalmente devido a suas ações sobre neuroproteção, inflamação e ativação microglial se destaca como uma via promissora de novos alvos terapêuticos, especialmente o receptor purinérgico P2X7 (P2X7R). Dessa maneira, o objetivo desta tese é caracterizar o envolvimento do sistema purinérgico na fisiopatologia do transtorno bipolar. De maneira geral, avaliamos metabólitos do sistema purinérgico em soro de pacientes e controles, correlacionando com dados clínicos. Avaliamos a frequência do polimorfismo do *P2RX7* 1513A>C em pacientes e controles. Realizamos um modelo animal farmacológico de mania e investigamos o envolvimento do P2X7R neste modelo e por último buscamos melhor compreender a ação neuroprotetora do lítio verificando a participação purinérgica. Nossos resultados primeiramente nos mostraram uma diminuição nos níveis de adenosina em pacientes em comparação a controles e uma importante correlação inversa entre os níveis de adenosina e a piora dos sintomas. Demonstramos ainda que pacientes com transtorno bipolar apresentam diminuição na frequência do alelo 1513C e o potencial aumento na frequência do genótipo 1513AA e 1513AA/AC em relação aos controles configurando um pior prognóstico de aumento da forma mais ativa do receptor. Também mostramos que o P2X7R possui um papel importante no estabelecimento do modelo de mania, modulando principalmente a via dopaminérgica que é refletida na mudança comportamental observada pelo modelo e por último, o lítio foi capaz de prevenir a resposta de insulto nas células neuronais (linhagem PC-12) e não foi capaz de prevenir a ativação mediada pelo P2X7R em células microgliais (linhagem N9), indicando uma resposta celular diferenciada. Podemos concluir que de maneira translacional conseguimos demonstrar a participação do sistema purinérgico na fisiopatologia do transtorno bipolar, sugerindo ainda um possível biomarcador tanto para diagnóstico como para progressão da doença, os níveis séricos de adenosina, e ainda um potencial biomarcador genético de predição e diagnóstico da doença, o polimorfismo do P2X7R 1513A>C, assim como contribuímos para o entendimento do mecanismo de ação do lítio e definimos um potencial novo alvo terapêutico para o transtorno, o receptor P2X7.

**Palavras-chave:** transtorno bipolar, P2X7R, 1513A>C, mania, lítio

## Abstract

Bipolar Disorder is a severe and chronic psychiatric disorder that presents an episodic course and high impact on the patient's functionality. It has potential for a high degree of severity, recurrence and intensity. The prevalence throughout life of bipolar disorder is 2.4% of the world population. The pathophysiology of this disorder is still not well understood and the drug of first choice is lithium, although its mechanism of action is not clear. The purinergic system mainly due to its actions on neuroprotection, inflammation and microglial activation stands out as a promising pathway for new therapeutic targets, especially the purinergic receptor P2X7 (P2X7R). Thus, the purpose of this thesis is to characterize the involvement of the purinergic system in the pathophysiology of bipolar disorder. In general, we evaluated purinergic system metabolites in serum from bipolar disorder patients and healthy controls, correlating with clinical data. We evaluated the frequency of *P2RX7* 1513A>C polymorphism in bipolar disorder patients and in healthy subjects. We performed a pharmacological animal model of mania and investigated the involvement of the P2X7 purinergic receptor in this model and finally we sought to better understand the neuroprotective action of lithium by verifying the purinergic participation. Our results primarily showed a decrease in adenosine levels in patients compared to controls and a significant inverse correlation between adenosine levels and worsening of symptoms. We also demonstrated that patients with bipolar disorder present a decrease in the frequency of the 1513C allele and the potential increase in the frequency of genotype 1513AA and 1513AA/AC in relation to controls, setting a worse prognosis of the most active form of the receptor. We also showed that P2X7R plays an important role in the establishment of the mania model, modulating mainly the dopaminergic pathway that is reflected in the behavioral change observed by the model. Finally, lithium was able to prevent the insult response in neuronal cells (PC-12 lineage) and was not capable of preventing P2X7R-mediated activation in microglial cells (N9 lineage), indicating a differentiated cellular response. We can conclude that in a translational way we could demonstrate the participation of the purinergic system in the pathophysiology of bipolar disorder. We also suggested a possible biomarker for both diagnosis and progression of the disorder, the serum adenosine levels, and a potential genetic marker for prediction and diagnosis, the polymorphism of P2X7R 1513A>C. Lastly we contributed to the understanding of lithium action mechanism and defined a potential new therapeutic target for the disorder, the P2X7 receptor.

**Key words:** bipolar disorder, P2X7R, 1513A>C, mania, lithium

## Lista de abreviaturas

<b>TB</b>	Transtorno Bipolar
<b>DSM</b>	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
<b>FAST</b>	Escala Breve de Funcionalidade
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>5-HTT</b>	Transportador de serotonina
<b>GWAS</b>	<i>Genome-wide association study</i>
<b>SNP</b>	Polimorfismos de nucleotídeo único
<b>CACNA1C</b>	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C
<b>ANK3</b>	Ankyrin-3
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>IL-6</b>	Interleucina - 6
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear - $\kappa$ B
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glicogênio sintase cinase 3 $\beta$
<b>AMPH</b>	D - anfetamina
<b>DAT</b>	Receptor de dopamina
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>UDP</b>	Uridina difosfato
<b>UTP</b>	Uridina trifosfato
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>NPP</b>	Nucleotídeo pirofosfatase/fosfosdiesterase
<b>NTPDase</b>	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
<b>APRT</b>	Adenina fosforibosiltransferase

<b>PNP</b>	Purina nucleosídeo fosforilase
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>E-NTPDase</b>	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
<b>E-NPPs</b>	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfosdiesterase
<b>Ecto- 5'-NT</b>	Ecto- 5'- nucleotidase
<b>e-AK</b>	Ecto-adenilato cinase
<b>PPi</b>	Pirofosfato inorgânico
<b>P1</b>	Receptor de adenosina
<b>P2X7R</b>	Receptor P2X7
<b>P2RX7</b>	Gene humano do receptor P2X7
<b>GLU</b>	Glutamato
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>AD</b>	Alzheimer
<b>PD</b>	Parkinson
<b>HD</b>	Huntington
<b>SE</b>	Epilepsia
<b>ALS</b>	Esclerose lateral amiotrófica
<b>MS</b>	Esclerose múltipla
<b>NFAT</b>	Fator nuclear de células T ativadas
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator induzido por hipóxia
<b>P2X7R<sup>-/-</sup></b>	Camundongos <i>knockout</i> para o P2X7R
<b>HAMD-R</b>	Escala de avaliação de depressão de Hamilton
<b>DAMP</b>	<i>damage-associated molecular patterns</i>
<b>BBG</b>	<i>Brilliant Blue G</i>
<b>DOPAC</b>	Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de episódios de humor e subtipos de transtorno bipolar.....	17
<b>Figura 2.</b> Visão geral da cascata do sistema purinérgico com os produtos, subprodutos e enzimas atuantes.....	28
<b>Figura 3.</b> Esquema do metabolismo dos nucleotídeos/nucleosídeos extracelulares via ectonucleotidases e a seletividade aos purinoreceptores.....	30
<b>Figura 4.</b> Visão geral de mecanismos mediados pelo P2X7R compartilhados por diferentes etiologias de doenças do sistema nervoso central.....	34
<b>Figura 5.</b> Representação de eventos de transdução de sinal após ativação do P2X7R na microglia.....	36
<b>Figura 6.</b> Estrutura esquemática do P2X7R diferenciando sua ação de canal iônico e abertura de poro.....	37
<b>Figura 7.</b> Topologia do P2X7R destacado o polimorfismo 1513A>C (Glu496Ala)....	135
<b>Figura 8.</b> Papel hipotético da inflamação e ativação microglial na fisiopatologia do TB.....	143
<b>Figura 9.</b> Diagrama esquemático da relação entre a ativação do P2X7R e a ativação microglial no TB.....	146

## **1. Introdução**

### **1.1. Transtorno Bipolar**

O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença crônica e grave caracterizada por apresentar curso episódico, com a ocorrência de duas condições psiquiátricas no mesmo indivíduo ao longo do tempo: depressão e humor elevado (mania ou hipomania) (Phillips and Kupfer 2013). Estima-se que a prevalência ao longo da vida do TB seja de 2,4% da população mundial (Merikangas et al. 2007), sendo igualmente prevalente entre homens e mulheres (Arts et al. 2011). Embora a prevalência possa parecer baixa comparada a outras doenças gerais ou ainda seja menor em comparação a outros transtornos psiquiátricos como depressão maior ( $\pm 20\%$ ) ou transtorno de ansiedade ( $\pm 30\%$ ), o TB possui maior impacto uma vez que os pacientes apresentam um significativo prejuízo funcional e social resultando em uma maior redução na qualidade de vida dos indivíduos (Phillips and Kupfer 2013), o que torna essa patologia uma das principais causas de incapacitação mundial (Belmaker 2004).

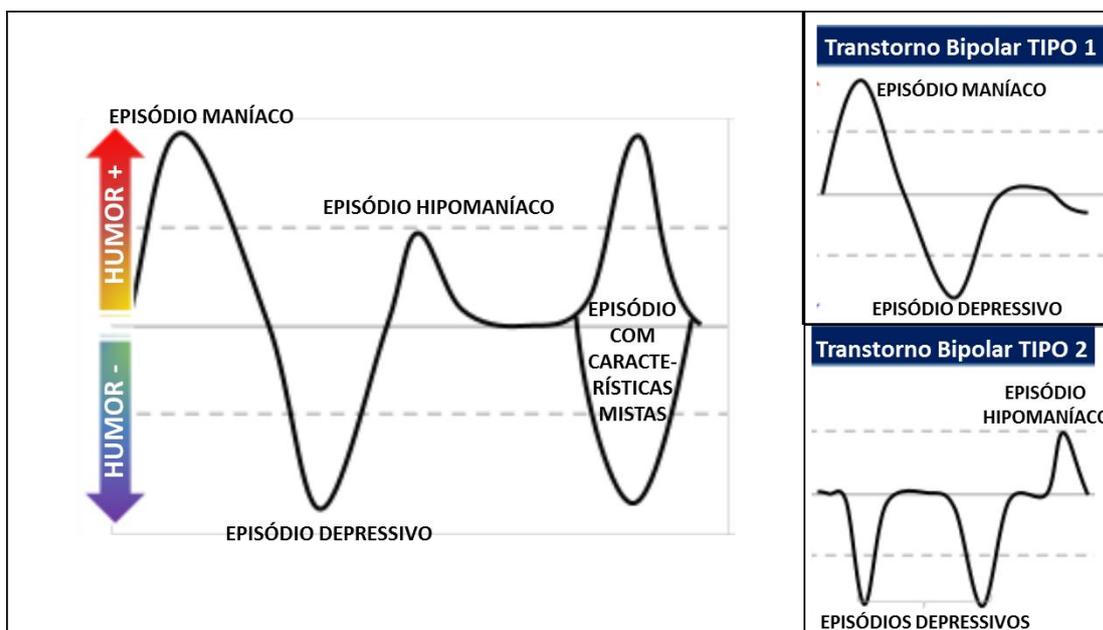
De acordo com a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5 (DSM - 5), o TB se diferencia em dois tipos principais: o Tipo I, em que a elevação do humor é grave e persiste (mania), e o Tipo II, em que a elevação do humor é mais branda (hipomania) (Bosaipo et al. 2017). A ocorrência de pelo menos um episódio maníaco ou hipomaníaco é suficiente para o diagnóstico de TB, do tipo I ou do tipo II, respectivo ao episódio (Belmaker 2004). O TB do tipo I é caracterizado por episódios maníacos ou mistos (sintomas maníacos e depressivos concomitantemente), geralmente intercalados por episódios depressivos, enquanto que

no TB do tipo II não ocorrem episódios maníacos, somente episódios hipomaníacos (Belmaker 2004). O episódio maníaco é definido pelo DSM-5 por um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado, expansivo ou irritável, com duração de no mínimo uma semana. Pode ser acompanhado de, entre outros sintomas, grandiosidade, diminuição da necessidade de sono, agitação psicomotora, aceleração do pensamento, comportamento direcionado a atividades prazerosas, potencialmente imprudentes e perigosas (Belmaker 2004). O episódio hipomaníaco assemelha-se ao episódio maníaco pelos sintomas e critérios do humor elevado, mas caracteriza-se como um episódio sem sintomas psicóticos ou sintomas que possam causar danos ou colocar em perigo a vida de um indivíduo ou a do próprio paciente; este apresenta uma duração mínima de 4 dias (Belmaker 2004).

Os episódios de depressão bipolar caracterizam-se por humor deprimido, perda de interesse, perda de apetite, perturbações no sono, retardo psicomotor, diminuição da velocidade de pensamento e fala, baixa autoestima e ideação suicida (Belmaker 2004). Assim como nos episódios maníacos, a gravidade pode variar consideravelmente – de uma discreta lentificação física e mental, com quase nenhuma distorção cognitiva ou da percepção, até quadros de estupor depressivo, com delírios, alucinações e obnubilação da consciência (Goodwin and Jamison 2007).

De maneira geral, os pacientes apresentam períodos de exacerbação dos sintomas, os episódios agudos, de depressão ou humor elevado, intercalados por períodos sub-sindrômicos e de remissão, chamados de eutímia (Belmaker 2004) (**Figura 1**). Entretanto, o curso da doença é bastante heterogêneo, alguns pacientes experimentam somente alguns episódios de humor durante a vida enquanto outros podem experimentar inúmeros (Jabben and Arts 2011). É aceito que uma alta proporção

de pacientes inicialmente diagnosticados com um episódio maníaco, apresentará um novo episódio durante a vida (Tohen et al. 2003) e ainda, existe uma previsão que afirma que o paciente com TB experienciará uma média de quatro episódios de humor nos dez anos seguintes ao diagnóstico (Solomon et al. 2010).



**Figura 1. Esquema de episódios de humor e subtipos de transtorno bipolar.** O curso da doença de um paciente pode ser registrado em gráfico de humor. Desse modo, um exemplo de como o humor pode variar é da hipomania para mania no topo da figura, para a eutímia (ou humor normal) no meio, e para a depressão na extremidade inferior da figura. Os esquemas à direita ilustram o curso dos principais subtipos do transtorno bipolar, o tipo 1 e o tipo 2 (adaptado de Bosaipo 2006 e Stahl 2013).

Tais alterações de humor são suficientemente graves a ponto de causar prejuízos tanto no âmbito ocupacional quanto social do indivíduo (Belmaker 2004). Neste contexto, o TB está associado a altos índices de desemprego e suicídio (Belmaker 2004, Kupfer 2005). As estimativas de tentativas de suicídio por indivíduos diagnosticados com TB variam entre 25-50% (Gilbert 2013). Levando em consideração ainda a carga

sobre família e amigos e o peso econômico, pode-se dizer que o TB possui um grande impacto na saúde pública (Gilbert 2013).

## **1.2. Impacto cognitivo e de funcionalidade do Transtorno Bipolar**

O TB possui como característica associada, a disfunção cognitiva e de funcionalidade, que contribuem de maneira importante para a redução da qualidade de vida dos pacientes (Martinez-Aran et al. 2007, Grande et al. 2016). Já foi demonstrado que indivíduos com TB apresentam prejuízo de funcionalidade mesmo durante a fase eutímica (Rosa et al. 2009, Rosa et al. 2010), refletindo uma piora cognitiva e clínica geral dos pacientes bipolares, o que contribui para a disfunção psicossocial associada ao transtorno (Zarate et al. 2000).

O conceito de funcionalidade é complexo, alguns estudos consideram este parâmetro levando em consideração aspectos de desempenho no trabalho (Cunha et al. 2006). Outros pesquisadores, por outro lado, sugerem considerar múltiplos domínios, tais como capacidade para o trabalho e estudo, para viver de forma autônoma, para manter uma vida social satisfatória e para realizar atividades de lazer (Daban 2006). Neste contexto tem sido amplamente utilizado um instrumento para avaliar a funcionalidade dos indivíduos, a Escala Breve de Funcionalidade (FAST) (Rosa et al. 2007, Cacilhas et al. 2009) que avalia o funcionamento psicossocial, considerando autonomia, trabalho, funcionalidade cognitiva, questões financeiras e relacionamentos interpessoais (Rosa et al. 2007). Inclusive, recentemente uma ideia de neuroprogressão para o TB tem sido estabelecida e a FAST, como parâmetro de avaliação de funcionalidade tem sido incluído como fator principal (Kapczinski et al. 2014, Kapczinski and Streb 2014, Grande et al. 2016).

Uma vez que pacientes com TB apresentam prejuízos cognitivos permanentes e déficits de funcionalidade (Torres et al. 2007), essas características são observadas em todos os estados da doença, inclusive na eutimia, sendo acentuados principalmente durante os episódios de humor (Martínez-Arán et al. 2004, Vieta et al. 2011). Essas observações clínicas são consistentes com estudos de neuroimagem onde pacientes com múltiplos episódios apresentam ventrículos mais alargados e atrofia de substância cinzenta em comparação com pacientes em primeiro episódio (Strakowski et al. 2002, Yatham, Lyoo et al. 2007).

Déficits cognitivos e prejuízo na funcionalidade comumente coexistem (Martinez-Aran et al. 2007). Melhores performances em atividades explorando a função executiva do córtex pré-frontal são correlacionadas positivamente com o *status* ocupacional. Pacientes com maior duração da doença, maior número de hospitalizações, tentativas de suicídio e número de episódios prévios de mania tendem a apresentar piores desempenhos em atividades avaliando funções executivas e memória verbal (Vieta et al. 2011). Piores desfechos de funcionalidade no TB também estão associados a morbidades depressivas, menores níveis educacionais, abuso de drogas, suporte social fraco e pobreza (Huxley and Baldessarini 2007, Wingo et al. 2009). Tais prejuízos cognitivos e de funcionalidade deve explicar, em parte, porque o TB é considerado uma das principais causas de incapacidade mundial.

### **1.3. Etiologia do Transtorno Bipolar**

Conceitualmente, tem sido proposto que o TB é uma patologia complexa e multifatorial. Embora a etiologia do TB ainda não esteja definida (Bobo 2017), é aceito

que o transtorno pode ser resultante da interação entre fatores genéticos que causam susceptibilidade e fatores ambientais, como estresse e eventos traumáticos (Caspi and Moffitt 2006, Barnett and Smoller 2009). Estudos tem demonstrado um alto componente hereditário na predisposição para o TB, de 73% a 93% (Johnson et al. 2008). Estudos com gêmeos indicaram uma incidência superior a 80% em gêmeos monozigóticos (Goodwin 2012). Ainda, parentes de primeiro grau de pacientes com TB possuem 7 vezes mais chances de desenvolver o transtorno comparado à população geral (Barnett and Smoller 2009, Lichtenstein et al. 2009).

O TB tipicamente emerge no final da adolescência ou início da vida adulta, geralmente em torno dos quinze aos trinta anos (Jabben and Arts 2011). Embora os primeiros episódios de mania podem se manifestar ao longo de toda a vida, a probabilidade de desenvolver TB diminui com a idade (DeRubeis et al. 2016). Dessa maneira, é aceito que o surgimento e a evolução do TB possam ser influenciados por trauma precoce, por eventos aversivos significativos da vida e pelo abuso de álcool e drogas. A probabilidade de um início precoce do TB aumenta significativamente em indivíduos com histórico familiar de TB e é comumente associado com um curso mais severo da doença, apresentando mais episódios agudos, sintomas psicóticos, transtorno de ansiedade e abuso de drogas (Goodwin and Jamison 2007). Os fatores genéticos podem ainda influenciar a idade de início do TB (Stahl 2013).

Nas últimas duas décadas uma série de estudos de ligação e de associação foram realizados com o objetivo de buscar a base genética do transtorno, que por definição é complexa e jamais será determinada por um gene em específico. Neste caso, uma série de possíveis genes candidatos têm sido identificados (Goes 2016). Os genes do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BDNF*), catecol-O-metiltransferase e transportador de serotonina (*5-HTT*) têm sido positivamente associados, embora também se associem

com outros transtornos psiquiátricos (Scola and Andreazza 2014). Os estudos de associação *genome-wide association study* (GWASs) que comparam a frequência de alelos em casos e controles e analisa milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido amplamente analisados e representam uma nova vertente de possibilidades de estudos. Alguns SNPs inclusive já foram apontados como positivamente associados com o TB, como os polimorfismos do gene do *calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C* (CACNA1C) e *ankyrin-3* (ANK3) (Goes 2016).

#### **1.4. Neurobiologia do Transtorno Bipolar**

Apesar dos estudos e avanços recentes sobre o TB que permitiram um melhor entendimento da fisiopatologia envolvida neste transtorno, a neurobiologia ainda está longe de ser completamente compreendida (Kapczinski et al. 2008). Por ser um transtorno multifatorial, sabe-se que vários fatores podem estar envolvidos no mecanismo da doença, incluindo sinalização através de fatores neurotróficos, inflamatórios, estresse oxidativo, entre outros (Berk et al. 2011, Rosenblat et al. 2014).

Estudos de neuroquímica evidenciam a importância do neurotransmissor dopamina nos episódios de mania (Berk et al. 2007). Estudos neuroanatômicos indicam ainda a presença de alterações no volume de regiões cerebrais específicas acompanhadas de atrofia ou perda celular no TB, o que aponta para um padrão neurodegenerativo da doença, com a presença de neuroinflamação, excitotoxicidade e prejuízo da neuroplasticidade (Hajek et al. 2005, Kim et al. 2007, Rao et al. 2010).

Estudos de imagem estrutural demonstraram volumes reduzidos de substância cinzenta em áreas do córtex orbital e pré-frontal medial, estriado ventral e hipocampo, assim como um alargamento significativo do terceiro ventrículo em comparação com

controles saudáveis (Beyer and Krishnan 2002). Estudos neuropatológicos *post-mortem* complementares mostraram ainda, reduções anormais no volume cortical, redução na contagem de células gliais e/ou no tamanho dos neurônios do córtex pré-frontal, córtex orbital, córtex pré-frontal ântero-lateral e amígdala (Deep-Soboslay et al. 2008). Algumas dessas mudanças parecem ser reversíveis com o tratamento com estabilizadores de humor (Sassi et al. 2002).

Existem muitas evidências de que o TB está associado à neuroinflamação (Mundo et al. 2003, Mueller and Meador-Woodruff 2004, Hashimoto et al. 2007, Kim et al. 2007, Rao et al. 2007), muitos estudos têm demonstrado o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com TB (Huang et al. 1997, Chang et al. 2008). As principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas com o TB são Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 6 (IL-6) (Chang et al. 2008). Autores (Goldstein et al. 2009) revisaram a literatura e encontraram 27 artigos relativos à inflamação e TB, relatando alterações de níveis de citocinas tanto durante estados de humor do TB (mania e depressão), quanto na fase de remissão. Da mesma maneira, foi descrito um aumento dos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias, interleucina - 6 (IL-6), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  assim como, um aumento do fator nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Maes et al. 1995, Ortiz-Domínguez et al. 2007, Drexhage et al. 2010).

Um estudo, em córtex pré-frontal *post-mortem* de indivíduos com TB em comparação com indivíduos sem o diagnóstico demonstrou um aumento significativo de níveis de mRNA de c-Fos e de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), um aumento dos níveis proteicos e de mRNA de interleucina-1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ), receptor de IL-1 $\beta$  e subunidades de NF- $\kappa$ B, assim como aumento de imunomarcção de marcador de ativação microglial (Rao et al. 2010). Os autores concluíram que marcadores de

excitotoxicidade e neuroinflamação estão significativamente mais expressos em CPF post-mortem de indivíduos com TB, em comparação a controles, sugerindo ainda que o aumento de expressão talvez esteja associado à morte celular, à atrofia cerebral e ao declínio cognitivo, todos descritos em pacientes com TB. Dessa forma, é discutido que a presença de excitotoxicidade, ativação microglial e neuroinflamação possam ser características importantes da fisiopatologia do TB.

### **1.5. Tratamento Farmacológico para o Transtorno Bipolar**

Em virtude do curso crônico e a frequente reincidência e gravidade dos sintomas de humor, o tratamento do TB é baseado no manejo dos episódios agudos e no tratamento de manutenção a fim de prevenir a ocorrência de novos episódios (Fountoulakis 2008). É muito comum que haja uma farmacoterapia combinada para o tratamento do TB, uma vez que esta prática tenha se mostrado superior à monoterapia na recorrência dos episódios (Vieta et al. 2011). Os fármacos mais utilizados para o TB são: os estabilizadores de humor (lítio, ácido valpróico e lamotrigina) e antipsicóticos atípicos (quetiapina, olanzapina e lurasidona) (Bobo 2017). Entretanto, a maioria dos tratamentos disponíveis até o momento continua imprecisa quer seja por eficácia incompleta ou por efeitos colaterais que limitam sua tolerabilidade (Associação Brasileira de Psiquiatria 2011).

O lítio possui grande destaque no tratamento do TB, com a sua longa aplicação clínica, sendo utilizado há mais de 50 anos, principalmente por ser um medicamento seguro para manter o estado eutímico do paciente, em especial naqueles que têm um alto risco de cometer suicídio (Geddes and Miklowitz 2013). O lítio é também utilizado

como monoterapia, por ser considerado uma droga com uma resposta efetiva, mesmo nos episódios agudos (Nivoli et al. 2012). Apesar da sua vasta utilização na clínica médica, os mecanismos de ação do lítio ainda não estão bem estabelecidos. Contudo, existe um aumento crescente nos estudos que propõe seus mecanismos, sendo algumas vias bastante relacionadas, como a estabilização e regulação do balanço eletrolítico nos neurônios monoaminérgicos pela sua penetração na membrana celular ou ainda a ação inibitória do lítio sobre a GSK3 $\beta$  (Bielecka and Obuchowicz 2008, Wang et al. 2013).

De qualquer maneira, a melhor compreensão da ação farmacológica do lítio poderia não somente contribuir para a aplicabilidade do medicamento como também contribuiria para o melhor entendimento da fisiopatologia do TB.

## **1.6. Modelo animal de mania**

A limitação farmacológica existente para o tratamento específico do TB se deve em parte a limitada disposição de modelos animais para o TB. De fato, o conhecimento raso acerca da etiologia e neurobiologia do TB reflete na dificuldade do desenvolvimento de modelos animais para o transtorno, uma vez que este apresenta-se de forma muito heterogênea na população e não há alvos bioquímicos ou genéticos específicos consolidados que possam ser manipulados para o desenvolvimento dos modelos (Logan and McClung 2016). Outros fatores que dificultam o desenvolvimento de modelos animais é o fato de o TB ser um transtorno cíclico, assim como o fato de que os mecanismos de ação das medicações estabilizadoras de humor são insuficientes. A maioria dos modelos animais utilizados é, portanto, específica para o episódio de mania ou para o episódio de depressão e poucos se aventuram em mimetizar a

ciclicidade e a recorrência típica do TB em animais (Post 2007, Logan and McClung 2016).

Existem diferentes abordagens para o desenvolvimento de modelos animais, podendo ser farmacológico, genético e/ou ambiental (Logan and McClung 2016). De maneira geral e de acordo com o comum para transtornos psiquiátricos, pode-se dizer que nenhum modelo animal utilizado representa de forma completa a complexidade do TB, mas alguns têm sido bem aceitos e bastante utilizados (Sharma et al. 2016). O modelo comportamental mais utilizado é a privação de sono enquanto que os modelos farmacológicos mais comuns são a administração de anfetamina (AMPH), ouabaína ou ainda agonistas de receptores D2 em roedores (Logan and McClung 2016, Sharma et al. 2016). Ainda, os modelos genéticos mais utilizados são o camundongo mutante para o gene *clockΔ19*, camundongos que superexpressam a GSK3 $\beta$  e camundongos *knockdown* para o transportador de dopamina (DAT) (Logan and McClung 2016, Sharma et al. 2016).

Pode-se dizer que o modelo animal de mania melhor consolidado na literatura é o modelo induzido pela administração de AMPH em ratos ou camundongos (Frey et al. 2006, Yates et al. 2007), baseando-se principalmente no fato que há um aumento nos níveis de dopamina em pacientes durante o episódio de mania (Joyce et al. 1995). Além do mais, muitos estudos demonstraram que psicoestimulantes como a AMPH podem produzir sintomas parecidos com a mania humana em indivíduos saudáveis, assim como exacerbar e induzir episódios agudos de mania em pacientes bipolares (Meyendorff et al. 1985, Cousins et al. 2009). As validades de constructo e de face do modelo têm sido comprovadas (Frey et al. 2006, Walz et al. 2008, Valvassori et al. 2010), correlacionando achados nos animais com dados clínicos e bioquímicos observados em pacientes, como a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo dos animais e piora

comportamental em testes de cognição (Fries et al. 2015). Da mesma forma, a validade preditiva tem sido comprovada uma vez que o tratamento com lítio é capaz de reverter o comportamento de hiperlocomoção induzido pela AMPH (Gould et al. 2001). Dessa maneira, mesmo com suas limitações inerentes, considera-se que este modelo farmacológico com AMPH é o modelo padrão-ouro para a mania em roedores (Gould et al. 2001).

## **2. Sistema purinérgico**

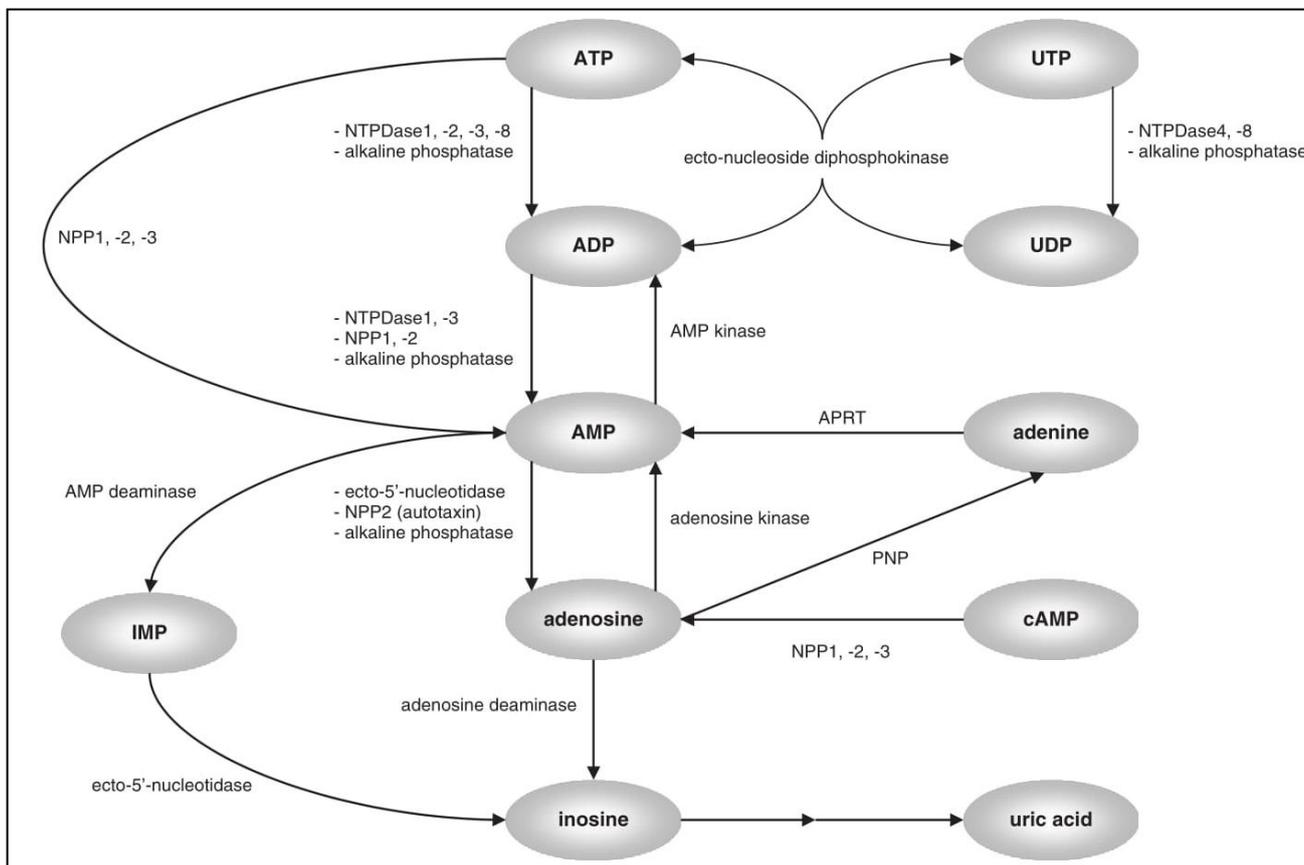
O sistema purinérgico tem sido amplamente estudado e relacionado com uma série de patologias diferentes com relevantes ações terapêuticas, como no caso da osteoporose, infarto do miocárdio, síndrome do intestino irritável, aterosclerose, diabetes e câncer (Burnstock 2017). Ainda, a sinalização purinérgica está emergindo como um importante meio de integração da atividade funcional entre os neurônios e a densa população de células ao redor, como a astroglia, a oligodendoglia, a microglia e as células vasculares, com trocas de informações bioquímicas entre elas. Essas interações podem intermediar os efeitos das atividades neuronais no desenvolvimento e estabelecimento de condições patológicas como desordens no SNC estabelecendo uma série de patologias, como doenças neurodegenerativas, inflamatórias e psiquiátricas (Burnstock 2017).

Já foi demonstrado que os constituintes do sistema purinérgico (purinas e pirimidinas extracelulares, ectonucleotídeos e receptores purinérgicos) são capazes de controlar processos fisiológicos como o sono, a atividade motora, o apetite, a cognição, a memória e a interação social (Machado-Vieira et al. 2002). Além disso, numerosos estudos correlacionam o sistema purinérgico com diversos transtornos psiquiátricos,

como o transtorno de ansiedade (Kittner et al. 2003), a depressão maior (Lucae et al. 2006), a esquizofrenia (Lara and Souza 2000) e, finalmente, com o TB (Machado-Vieira et al. 2002, Barden et al. 2006, Gubert et al. 2016). Neste sentido, a sinalização purinérgica parece ser uma promissora via de estudo para transtornos afetivos.

## **2.1. Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares**

Purinas extracelulares, como adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina, e pirimidinas como a uridina difosfato (UDP) e a uridina trifosfato (UTP) são moléculas sinalizadoras importantes que medeiam diversos efeitos biológicos, através da ativação de receptores purinérgicos (Ralevic and Burnstock 1998). Esses nucleotídeos e nucleosídeos podem ser liberados para o meio extracelular por diferentes mecanismos fisiológicos, como a exocitose, a difusão, por transportadores específicos, ou mecanismos patológicos, como por extravasamento após lise celular (Verkhatsky et al. 2009). Pela ação das ectonucleotidases, o ATP é hidrolisado a ADP, que é hidrolisado a adenosina monofosfato (AMP), que, por sua vez, é hidrolisado a adenosina. Por fim, a adenosina é desaminada à inosina que é convertida em hipoxantina sendo oxidada a xantina e se converte, em última instância, em ácido úrico no meio extracelular (Bours et al. 2006) (via esquematizada na **Figura 2**).



**Figura 2. Visão geral da cascata do sistema purinérgico com os produtos, subprodutos e enzimas atuantes.** NPP: nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; NTPDase: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; APRT: adenina fosforibosiltransferase; PNP: purina nucleosídeo fosforilase. (adaptado de Bours et al. 2006).

O ATP intracelular possui papel central na homeostase energética, sendo o produto principal de reações como fotofosforilação, respiração e fermentação, agindo como um doador energético na maioria dos processos biossintéticos endergônicos que suportam a sobrevivência celular, proliferação e motilidade. O citoplasma da maioria das células de mamíferos contém uma concentração de ATP na faixa de 5 - 10 mM, e ainda maiores concentrações são armazenadas na forma de vesículas em terminais sinápticos de neurônios (Adinolfi et al. 2017). Uma vez no meio extracelular, o ATP possui papel sinalizador, como na proliferação, na mitogênese e na diferenciação celular (Burnstock and Verkhratsky 2010), sendo que em altas concentrações, o ATP extracelular causa efeitos citotóxicos (Lemmens et al. 1996). Especificamente no

sistema nervoso central (SNC) o ATP extracelular pode agir tanto como neurotransmissor de excitação rápida, por meio da sustentação das ondas de  $\text{Ca}^{+2}$  entre os astrócitos, quanto como neuromodulador (Fam et al. 2000). Uma vez que a concentração extracelular de ATP está na faixa nanomolar em situações fisiológicas, mesmo uma pequena liberação de ATP pode gerar um sinal muito significativo, devido a este baixo *background* (Adinolfi et al. 2017).

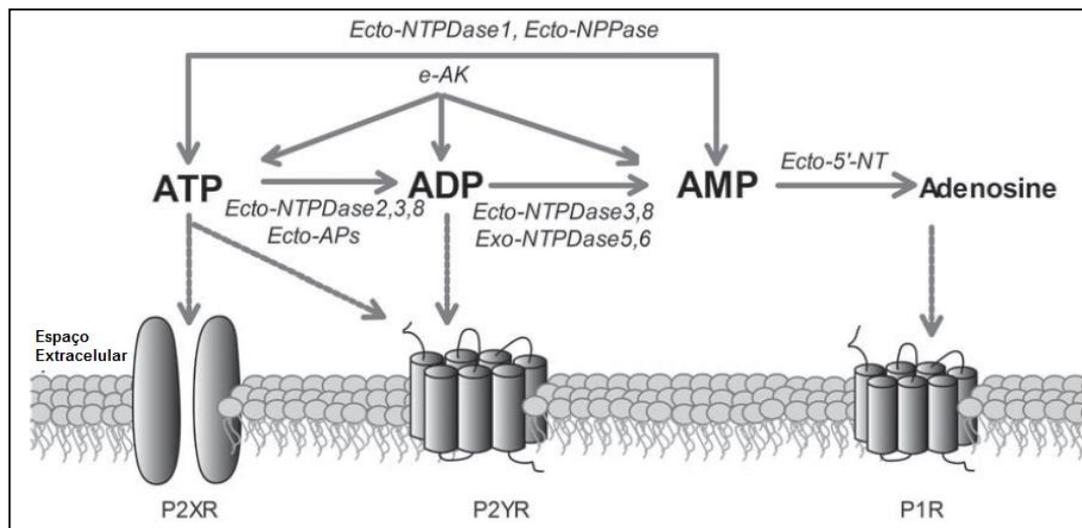
Neste contexto, estudos demonstram que o ATP é capaz de ativar as células microgliciais para liberar citocinas (Sanz and Di Virgilio 2000) e, portanto, parece agir de forma pró-inflamatória, enquanto que a adenosina, produto da hidrólise desse nucleotídeo, pode possuir efeito anti-inflamatório (Bours et al. 2006, Di Virgilio et al. 2009). A adenosina, é ainda um neuromodulador capaz de mediar a neuroproteção por meio da diminuição da excitabilidade da membrana, limitando o influxo de cálcio e exercendo efeitos moduladores sob as células gliais (Ribeiro et al. 2003). Além disso, ela está bem estabelecida como um inibidor pré-sináptico, reduzindo a liberação de neurotransmissores como o glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina (Brundege and Dunwiddie 1997).

De maneira geral, estas moléculas possuem características muito interessantes e promissoras na modulação do sistema nervoso central, indicando uma fundamental via de estudo para transtornos psiquiátricos.

## **2.2. Ectonucleotidases**

As ectonucleotidases são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos até seus respectivos nucleosídeos, constituindo uma cascata enzimática altamente eficiente, são

responsáveis pelo controle da concentração e do tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no meio extracelular estimulando seus receptores (Zimmermann 2000). A família das ectonucleotidases é composta pelas E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), E-NPPs (ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterases), ecto-fosfatases alcalinas e pela ecto- 5'- nucleotidase (ecto- 5'-NT) (Yegutkin 2008) (**Figura 3**).



**Figura 3. Esquema do metabolismo dos nucleotídeos/nucleosídeos extracelulares via ectonucleotidases e a seletividade aos purinoreceptores.** Ecto-NTPDase: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; Ecto-NPPase: nucleotídeos pirofosfatase/fosfodiesterase; e-AK: ecto-adenilato cinase; Ecto-5'-NT: ecto-5'-nucleotidase; Ecto-APs: ecto-fosfatases alcalinas; P2XR: purinoreceptor P2X; P2YR: purinoreceptor P2Y; P1R: purinoreceptor P1 (adaptado de Roszek and Czarnecka 2015).

Estudos demonstram que as NTPDases 1, 2 e 3 estão expressas no cérebro de mamíferos e são capazes de controlar a sinalização do ATP na fenda sináptica (Kukulski et al. 2005). A NTPDase1 está localizada na superfície endotelial dos vasos sanguíneos do SNC e é primariamente expressa na microglia (Braun et al. 2000). Enquanto isso, a NTPDase2 está associada com células progenitoras no cérebro de

roedores adultos (Braun et al. 2003) e está expressa na porção muscular dos vasos sanguíneos, nos astrócitos, nas células de Schwann não mielinizantes e em outras células gliais do sistema nervoso central e periférico (Robson et al. 2006). A NTPDase3, por sua vez, está expressa em múltiplas regiões do cérebro, primariamente em neurônios, assim como na superfície celular da linhagem PC12, célula de cultura celular derivada de feocromocitoma de rato, onde se expressa como a ectonucleotidase predominante (Vorhoff et al. 2005). Tem se visto que a modulação da atividade das NTPDases participa de diversos processos fisiológicos e patológicos no SNC tais como convulsões e epilepsia, alterações hormonais, estresse e respostas nociceptivas (Cognato et al. 2005, Cognato et al. 2010, Horvat et al. 2010).

As E-NPPs são responsáveis pelo catabolismo de dinucleotídeos extracelulares, além do ATP como substrato. Sua atividade tem dependência de cátions bivalentes, de pH fortemente alcalino e é inibido por glicosaminoglicanos (Bonan 2012). Essa família de enzimas consiste em sete enzimas relacionadas (Zimmermann et al. 2012). Essas enzimas possuem uma atividade fosfodiesterase alcalina e nucleotídeo pirofosfatase. Duas das ectoenzimas, as NPP1 e NPP3, são capazes de hidrolisar ATP e polifosfatos de diadenosina (Yegutkin 2014). Elas são capazes de hidrolisar ATP direto em AMP, liberando pirofosfato inorgânico (PPi) (Goding et al. 2003), além disso, elas também hidrolisam dinucleosídeos polifosfatados (Vollmayer et al. 2003). A NPP1 está expressa nos capilares do cérebro, não estando presente em neurônios ou na glia (Goding et al. 2003). A NPP2 tem sido identificada em diferenciação de oligodendrócitos e na formação de mielina (Goding et al. 2003) e a sua produção de ácido lisofosfatífico parece ser importante para a maturação cerebral. Ela é expressa no hipocampo, no córtex, no bulbo olfatório, no cerebelo e no estriado durante o desenvolvimento (Bavaresco et al. 2008). Em contrapartida, a NPP3 é expressa nas células epiteliais do

plexo coroide, podendo contribuir na secreção do líquido cefalorraquidiano (Bonan 2012).

Em diversos estudos tem se observado o envolvimento da ecto-5'-nucleotidase, no SNC, uma vez que essa ectonucleotidase é ubíqua e está expressa tanto em neurônios, quanto em células gliais (Kovács et al. 2013). Ela possui alta atividade no córtex temporal, no tálamo, em membranas sinápticas do hipocampo, no cerebelo e na medula oblonga; além disso, possui atividade intermediária no lobo parietal, na ínsula, no núcleo caudado, no putâmen, na amígdala, no hipotálamo, no mesencéfalo; e, ainda, baixa atividade no córtex cerebelar, no corpo caloso, no corpo mamilar e no corpo geniculado lateral, por exemplo (Kukulski et al. 2004).

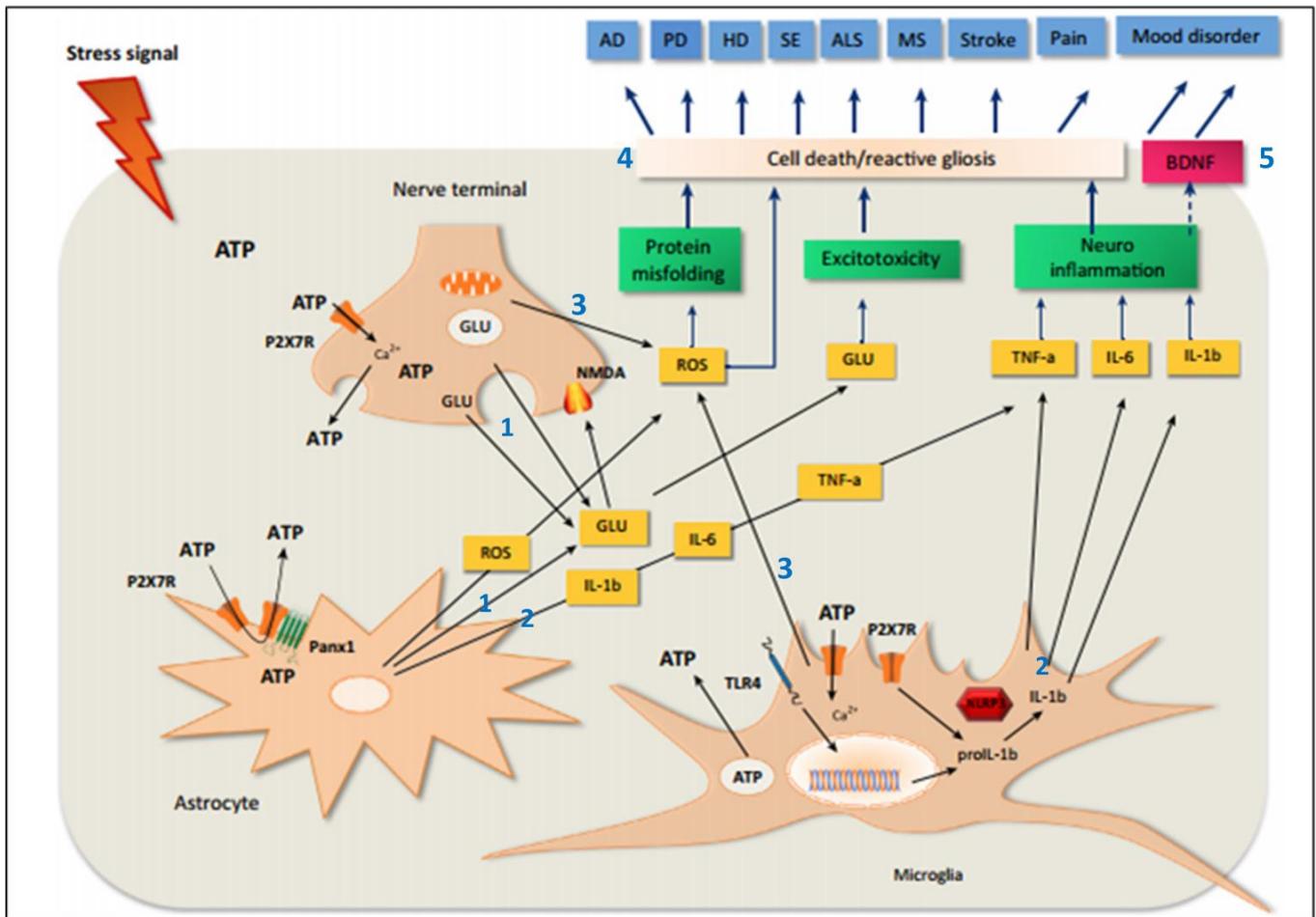
Considerando o papel da hidrólise do AMP pela ecto-5'-nucleotidase e que a adenosina, produto dessa reação, regula funções neuronais e gliais no encéfalo (Burnstock 2006, Burnstock et al. 2011), participa da modulação do sono e memória (Burnstock 2007, Burnstock et al. 2011) e que, ainda, possui uma função neuroprotetora, pode-se sugerir que a ecto-5'-nucleotidase é responsável indireta pela modulação da neurotransmissão, pela regulação dos processos fisiológicos descritos anteriormente, pela maleabilidade sináptica, pelo processamento de informações, pela regeneração e desenvolvimento neuronal (Stanojević et al. 2011), pela adesão célula-célula (Resta et al. 1998) e pela regulação do volume celular glial (Wurm et al. 2010).

Esses dados sugerem que existe uma importante plasticidade adaptativa da via das ectonucleotidases, tendo como principal função no SNC proteger as células desse órgão nobre, evitando acúmulos, ausência e estímulos exacerbados dessas moléculas de sinalização, quando necessário. De maneira geral, no sentido de uma diminuição dos níveis de ATP, e um aumento dos níveis de adenosina, uma vez que esta é uma molécula neuroprotetora (Bonan 2012).

### 2.3. Purinoreceptores

Os purinoreceptores são divididos em duas classes: P1 e P2 (Ralevic and Burnstock 1998). Os receptores P1 são sensíveis à adenosina, sendo subdivididos em A1, A2a, A2b e A3, todos acoplados à proteína G, estão ligados a vias de sinalização intracelulares que desempenham importantes papéis na sobrevivência das células (Zimmermann 2006). Os receptores do tipo P2 têm grande preferência por nucleosídeos di- e trifosfatados, como ATP e o ADP, e são subdivididos em P2X (ionotrópicos) e P2Y (metabotrópicos) (White and Burnstock 2006). São conhecidos sete subtipos de receptores P2X (P2X1,2,3,4,5,6 e 7) cujo principal ligante é o ATP, e oito subtipos de receptores P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14) que são sensibilizados por ATP, ADP entre outros nucleotídeos (White and Burnstock 2006).

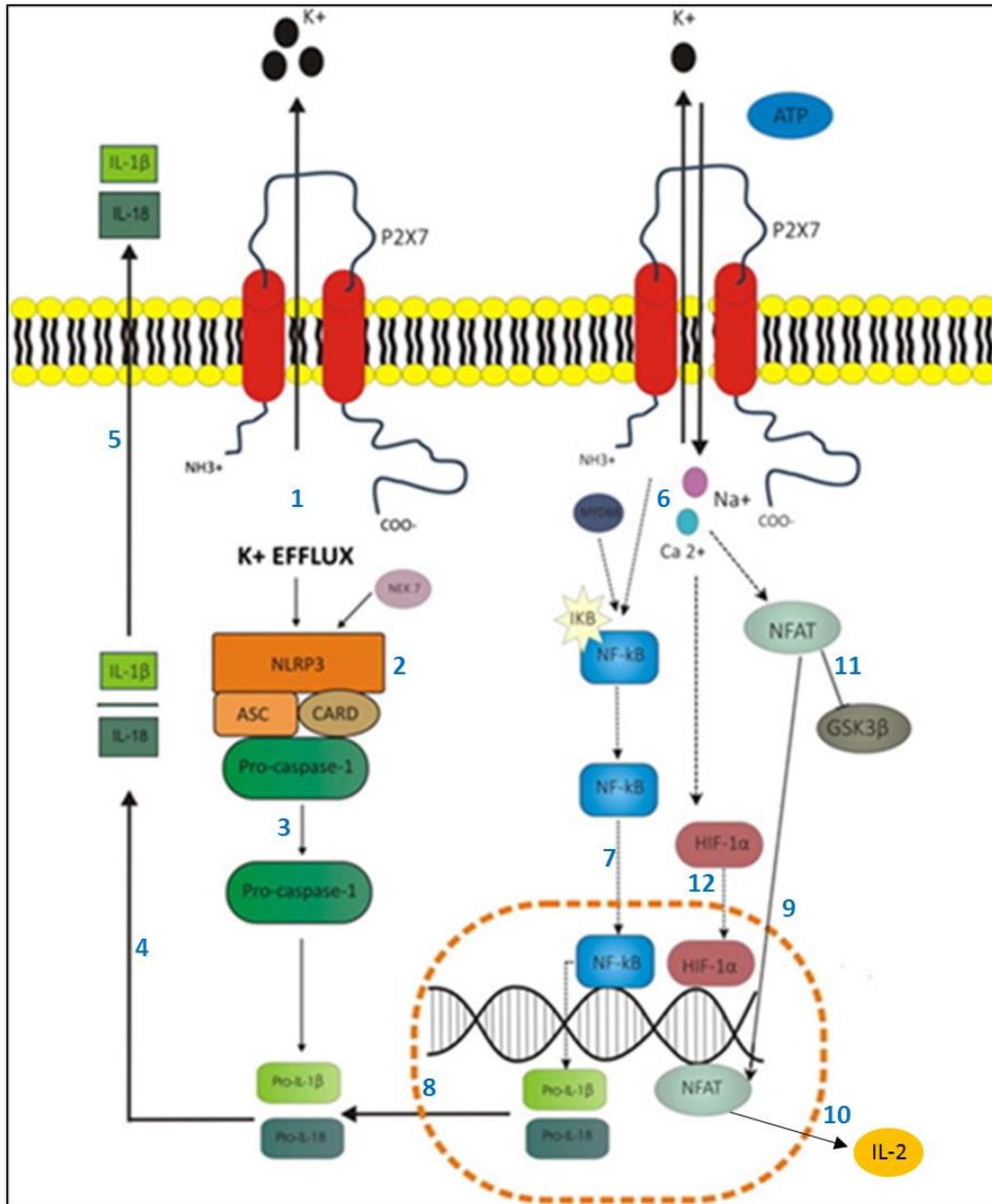
Os receptores purinérgicos, são amplamente distribuídos no corpo humano, de tecidos não neurais aos tecidos neurais, podendo ser encontrados em plaquetas, células epiteliais, placenta, pele, neurônios e células gliais, por exemplo (Burnstock and Knight 2004). Dentre os constituintes do sistema purinérgico, um receptor possui destaque e tem sido amplamente explorado no contexto de doenças que acometem o sistema nervoso central, com especial enfoque em doenças psiquiátricas, principalmente por possui funções de destaque na sinalização inflamatória e de ativação microglial: o receptor P2X7 (P2X7R) (Burnstock 2017) (**Figura 4**).



**Figura 4. Visão geral de mecanismos mediados pelo P2X7R compartilhados por diferentes etiologias de doenças do sistema nervoso central.** Sinais de estresse que levam ao aumento da concentração de ATP extracelular são capazes de desencadear a ativação de P2X7R de neurônios e células gliais. A ativação do P2X7R (1) libera glutamato (GLU) dos terminais nervosos e astrocíticos que pode levar à excitotoxicidade; (2) induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias levando à neuroinflamação; (3) aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, assim, agrava o dobramento de proteínas culminando a danos neuronais; (4) induz direta ou indiretamente à morte celular e à seguinte astrogliose reativa; e (5) direta ou indiretamente diminui a produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a posterior neuroplasticidade. Estes principais mecanismos podem se manifestar e contribuir para a patologia da doença na doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (PD), doença de Huntington (HD), epilepsia (SE), esclerose lateral amiotrófica (ALS), esclerose múltipla (MS), acidente vascular cerebral, dor e distúrbios do humor em diferentes formas e proporções, dependendo da etiologia (adaptado de Sperlágh and Illes 2014).

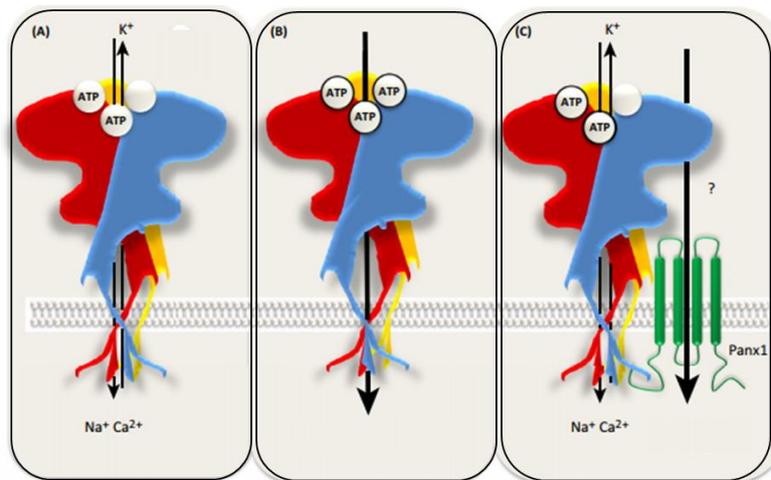
## 2.4. Receptor Purinérgico P2X7

O P2X7R como membro pertencente à família de receptores purinérgicos P2X, é caracterizado por ser um trímero, com as três subunidades de proteínas dispostas em torno de um poro permeável a cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) (North 2016). As subunidades são caracterizadas por possuir um terminal intracelular curto - amino (N) e um terminal intracelular longo - carboxi (C), assim como dois domínios hidrofóbicos transmembrana separados por um longo domínio extracelular glicosilado para ligação do ATP (Bartlett et al. 2014). Embora compartilhe características típicas da família dos P2X, este receptor se destaca de diversas maneiras, sendo único. A subunidade monomérica do P2X7R por exemplo, é maior que o resto da família, possuindo 595 aminoácidos que refletem em um maior C-terminal intracelular, conferindo respostas intracelulares complexas desencadeadas pela ativação do receptor (Bradley et al. 2011) (ver **Figura 5**). Estes eventos de sinalização são dependentes de uma variedade de fatores, como o tipo celular, condições extracelulares e concentração extracelular de ATP (Burnstock 2007).



**Figura 5. Representação de eventos de transdução de sinal após ativação do P2X7R na microglia.** Após a ativação P2X7R, (1)  $K^+$  é liberado da célula causando a (2) montagem de inflammasoma NLRP3. O inflammasoma induz a (3) ativação da pro-caspase-1 em caspase-1, o que provoca a (4) maturação de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL18, (5) permitindo a liberação. Além disso, o P2X7R, (6) via influxo de  $Ca^{2+}$  promove a (7) translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, induzindo a (8) expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias. Também desencadeia a (9) translocação de NFAT dependente de  $Ca^{2+}$  que por sua vez causa secreção (10) de IL-2 e (11) modulação negativa de GSK3 $\beta$ . Ainda, o P2X7R promove a (12) ativação do HIF-1 $\alpha$ , fator induzido por hipóxia (adaptado de Adinolfi et al. 2017).

Outra característica muito importante que justifica a peculiaridade deste receptor e o faz se destacar dentro de sua própria família é o fato de apresentar uma baixa afinidade ao ATP (a partir de 0,1mM), sendo capaz, nesta situação, de formar um poro permeável a solutos hidrofílicos de até 900 Da, sob ativação sustentada (Skaper et al. 2010) (**Figura 6**). Em condições normais, o ATP está presente em baixas concentrações no meio extracelular, e aumenta significativamente em quadros inflamatórios (Lazarowski et al. 2000), em resposta à trauma (Nieber et al. 1999), dano celular, infecção ou ainda em ambientes tumorais, sendo comum a ativação do P2X7R nestas condições (Lenertz et al. 2011). Por esse motivo é fundamental a presença de ectonucleotidases que degradam o ATP a fim de regular sua concentração e a duração da disponibilidade deste nucleotídeo no espaço extracelular (Yegutkin 2008).



**Figura 6. Estrutura esquemática do P2X7R diferenciando sua ação de canal iônico e abertura de poro.** O P2X7R é um homotrímero, formando uma estrutura de cálice. São três os sítios de ligação ao ATP e estão localizados um em cada subunidade. (a) para a abertura do canal iônico é necessário a ocupação de dois sítios de ligação que levam ao fluxo dos cátions e (b e c) para a abertura do poro é necessário a ligação do terceiro sítio de ligação, o que configura a ativação em resposta a maiores concentrações de ATP ou ainda uma ativação sustentada. Um mecanismo potencial da formação de poros é a dilatação do próprio canal iônico (b) ou ainda a associação a proteínas de formação de poros (c), como as panexinas, embora ainda não esteja completamente elucidado. De qualquer maneira, torna a membrana permeável permitindo a passagem de moléculas de alto peso molecular (adaptado de Sperlágh and Illes 2014).

Este receptor é amplamente distribuído em todos os tecidos (Burnstock and Knight 2004). No SNC, receptores P2X7 são encontrados principalmente na microglia, células de Schwann e astrócitos, embora também sejam expressos em neurônios (Ferrari et al. 1996, Collo et al. 1997, Sim et al. 2004). O P2X7R ativa uma gama diversificada de respostas celulares relativa ao tipo celular em que é expresso, incluindo produção de espécies reativas de oxigênio (Apolloni et al. 2013), ativação e liberação de proteases (Miller et al. 2011), induz efluxo de glutamato (Marcoli et al. 2008), proliferação celular (Adinolfi et al. 2010), fagocitose, ativação microglial (Skaper et al. 2009) e a bem estabelecida função de morte celular (Sluyter 2017). Ainda, o P2X7R é considerado o regulador fisiológico da secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , via ativação de caspase-1 que leva à ativação do complexo inflamassoma NLRP3, fundamental para o processamento e liberação desta citocina (Muñoz-Planillo et al. 2013), como já anteriormente descrito, destacando o P2X7R como importante mediador inflamatório.

De maneira geral, o P2X7R possui um papel importante na modulação da neurotransmissão glutamatérgica, na liberação de citocinas pró-inflamatórias/fatores de excitotoxicidade, no estabelecimento e manutenção da ativação microglial e no dano/morte neuronal (Sun 2010, Sluyter 2017). Considerando que todos esses fatores modulados pelo P2X7R são descritos na fisiopatologia do TB, é racional supor que este receptor possa estar envolvido com o transtorno.

### 3. P2X7R e Transtorno Bipolar

O gene do P2X7R que codifica o receptor está localizado no cromossomo 12q24. Esta região tem sido implicada em estudos de ligação a vários transtornos psiquiátricos, incluindo depressão maior (Abkevich et al. 2003, Zubenko et al. 2003, McGuffin et al. 2005, Lucae et al. 2006) e TB (Dawson et al. 1995, Ewald et al. 1998, Morissette et al. 1999, Degen et al. 2001, Maziade et al. 2001, Curtis et al. 2003, Shink et al. 2005).

Polimorfismos de nucleotídeo único, ou ainda SNPs, são bastante comuns em genes de receptores P2, particularmente no gene do P2X7R que é considerado um gene altamente polimórfico (Roger et al. 2010). Esses SNPs são implicados na susceptibilidade a patologias, na compreensão da etiologia de doenças e na função do receptor em determinada condição, configurando promissores biomarcadores para o diagnóstico e tratamento (revisado em (Caseley et al. 2014)). Para transtornos afetivos como o TB, alguns SNPs do P2X7R em particular foram bastante estudados, como os SNPs que conferem ganho de função ao receptor: 1405A>G (rs2230912) (Barden et al. 2006, McQuillin et al. 2009) e 1068G>A (rs1718119) (Erhardt et al. 2007). Embora resultados incongruentes não permitam uma associação definitiva (Green et al. 2009, Caseley et al. 2014), esta parece ser uma ferramenta promissora para o estudo do P2X7R nos transtornos de humor.

Por outro lado, em camundongos *knockout* para o P2X7R (P2X7R<sup>-/-</sup>), analisados em modelos de depressão e ansiedade, foi encontrado um chamado fenótipo *antidepressive-like*, um fenótipo de resistência à depressão maior, somado a uma maior capacidade de resposta a uma dose subterapêutica de imipramina, o antidepressivo mais utilizado no tratamento farmacológico da depressão maior (Basso et al. 2009, Skaper et

al. 2010). De maneira muito interessante, trabalhos recentes demonstraram que o bloqueio/deleção do P2X7R diminui a hiperatividade induzida por AMPH (Bhattacharya et al. 2013, Csölle et al. 2013). Da mesma maneira, resultados obtidos a partir de estudos do nosso grupo fornecem evidências de uma relação entre o receptor P2X7, a hiperatividade locomotora e o aumento do ambiente pró-inflamatório induzido por anfetamina, uma vez que a deleção gênica e o bloqueio farmacológico deste receptor foi capaz de prevenir esses desfechos (Gubert et al. 2016). Por outro lado, estudos anteriores provenientes do nosso laboratório demonstraram que o tratamento agudo (*in vitro*) e crônico (*in vivo*) com lítio e valproato previnem a morte celular induzida por ATP (Wilot et al. 2007), provavelmente via P2X7R, sugerindo ainda que a modulação deste receptor poderia possuir um papel no mecanismo de ação destas drogas, mecanismos estes que ainda não são bem compreendidos.

Estes achados suportam a idéia de que este receptor possa também ser considerado um novo alvo terapêutico para o TB (Burnstock 2017), deixando em aberto a necessidade de estudos complementares que confirmem esta hipótese e talvez, de maneira mais importante, são necessários estudos que caracterizem a via de relação deste receptor ao TB.

## **Objetivo**

O objetivo geral desta tese é investigar o envolvimento do sistema purinérgico na fisiopatologia do transtorno bipolar.

## **Objetivos específicos**

### **Capítulo 1**

Avaliar os níveis séricos de metabólitos purinérgicos em pacientes com transtorno bipolar e correlacionar com dados clínicos.

### **Capítulo 2**

Verificar a frequência do polimorfismo do P2X7R 1513A>C (rs3751143) e a expressão do receptor em pacientes com transtorno bipolar.

### **Capítulo 3**

Investigar o envolvimento do receptor P2X7 em um modelo animal de mania.

### **Capítulo 4**

Melhor compreender a ação neuroprotetora do lítio e verificar a participação purinérgica.

## **PARTE II**

## **Capítulo 1**

### **Peripheral adenosine levels in euthymic patients with bipolar disorder**

Carolina Gubert, Cesar Eduardo Jacintho Moritz, Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno, Bárbara Tietbohl Martins Quadros dos Santos, Juliana Sartori, Adam Fijtman, Márcia Kauer-Sant' Anna, Flavio Kapczinski, Ana Maria Oliveira Battastini, Pedro Vieira da Silva Magalhães

Periódico: **Psychiatry Research**

Status: **Publicado**



## Peripheral adenosine levels in euthymic patients with bipolar disorder



Carolina Gubert<sup>a</sup>, Cesar Eduardo Jacintho Moritz<sup>b</sup>, Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno<sup>c</sup>, Bárbara Tietböhl Martins Quadros dos Santos<sup>c</sup>, Juliana Sartori<sup>c</sup>, Adam Fijtman<sup>c</sup>, Márcia Kauer-Sant'Anna<sup>a,c,d,e</sup>, Flávio Kapczinski<sup>c,d,e</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>a,b,\*</sup>, Pedro Vieira da Silva Magalhães<sup>c,d,e,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Bipolar Disorder Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> INCT of Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-903 RS, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal Rio Grande do Sul, 90035-903 RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bipolar disorder  
Adenosine  
Psychosocial functioning  
Purineric signaling  
Uric acid

### ABSTRACT

Recent evidence points to the involvement of the purineric signaling in the pathophysiology of bipolar disorder. The aim of this study was to assess the serum levels of adenosine and to evaluate its relation to functioning in 24 euthymic patients with bipolar disorder type I and in 25 matched healthy controls. Subjects were evaluated using the functioning assessment short test. Serum purine levels were measured by high pressure liquid chromatography. Our results show a decrease in serum adenosine levels in bipolar disorder patients compared with controls ( $t = -4.8$ ,  $df = 43.96$ ,  $p < 0.001$ ). Moreover, a significant negative correlation was found between patient adenosine levels and depression scale scores ( $r = -0.642$ ,  $p = 0.001$ ). Higher functional impairment was linked to lower levels of adenosine in patients ( $\rho = -0.551$ ,  $p = 0.008$ ). Taken together, our results provide evidence for a purineric imbalance in bipolar disorder, specifically an adenosineric dysfunction. Our results also indicate a relation between adenosine levels and the functional impairment caused by the disorder, which could demonstrate a potential relation of adenosine levels in worsening of symptoms.

### 1. Introduction

Bipolar disorder is a severe and chronic psychiatric disorder associated with increased morbidity, mortality and suicide rates (Kupfer, 2005; Roshanaei-Moghaddam and Katon, 2009). This lifelong episodic illness has a variable course and can often result in functional and cognitive impairment that could lead to an important reduction in patients' quality of life (Grande et al., 2016; Martinez-Aran et al., 2007). People with bipolar disorder have functional impairment even during euthymic phases (Rosa et al., 2010). Recently, an idea of neuroprogression for bipolar disorder has been established, with a theory of progressive modifications that includes a decrease in functioning as a fundamental factor (Grande et al., 2016; Kapczinski et al., 2014; Kapczinski and Streb, 2014).

There is increasing evidence suggesting an important role of inflammatory processes in the periphery and the brain (neuroinflam-

mation) (Berk et al., 2011; Pfaffenseller et al., 2013; Stertz et al., 2013), with the presence of increased plasma and post-mortem frontal cortex levels of pro-inflammatory cytokines in people with bipolar disorder (Kim et al., 2007; Ortiz-Domínguez et al., 2007; Rao et al., 2010). Recent evidences also indicate the involvement of purineric signaling in the pathophysiology of bipolar disorder, such as an increasing in uric acid levels in bipolar disorder subjects and the involvement of the purineric receptor P2 $\times$ 7 in a preclinical model of mania (Albert et al., 2015; Gubert et al., 2014; Ortiz et al., 2015). This system includes extracellular nucleotides and nucleosides (e.g. adenosine), representing signaling molecules involved in several pathways, such as immune response and neuromodulation (Burnstock, 2008).

Adenosine, particularly, has gained special attention in psychiatric disorders (Krügel, 2016; Lara et al., 2006). It modifies cell function by operating four different cell membrane G-protein-coupled receptors (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>), all widely distributed in the central nervous

\*\* Correspondence to: Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

\* Correspondence to: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.  
E-mail addresses: [abattastini@gmail.com](mailto:abattastini@gmail.com) (A.M.O. Battastini), [pedromaga2@gmail.com](mailto:pedromaga2@gmail.com) (P.V.d.S. Magalhães).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2016.10.007>

Received 2 June 2016; Received in revised form 23 August 2016; Accepted 5 October 2016

Available online 05 October 2016

0165-1781/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

system (CNS) (Burnstock et al., 2011). Adenosine is involved in the regulation of important CNS mechanisms, such as cognition and memory, aggression, anxiety (Ribeiro et al., 2003) and appears to modulate glutamatergic and dopaminergic neurotransmission (Boison, 2008), important molecules in bipolar disorder. Thereby, adenosine is an endogenous neuroprotective compound and has been shown to have anti-inflammatory properties in several *in vitro* and *in vivo* systems (Cekic and Linden, 2016), with the ability to decrease levels of pro-inflammatory cytokines via the activation of adenosine receptors (Cekic and Linden, 2016; Haskó et al., 1996; Montes et al., 2016; Sajjadi et al., 1996).

Since adenosine has been implicated as an anti-inflammatory molecule in bipolar disorder, its measurement in patients with bipolar disorder would be relevant, and to our knowledge no work so far has done. Therefore, the aim of this study was to assess the serum levels of adenosine and its degradation products, e.g., inosine, xanthine, hypoxanthine and uric acid, and to evaluate the relationship between psychosocial functioning in euthymic patients with bipolar disorder type I and healthy controls.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

The present study was approved by the Ethical and Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, protocol number 12-0102. All procedures were performed in accordance with the ethical standards set forth in the Declaration of Helsinki. Moreover, all subjects provided written informed consent after receiving a complete description of the study before their inclusion.

Twenty four chronic treated euthymic patients with bipolar disorder type I were recruited at the Bipolar Disorders Program (PROTAHBI), an outpatient program of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Patients with bipolar disorder were diagnosed according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition (DSM-5) criteria (American Psychiatric Association, 2013). Patients were considered euthymic, and were thus eligible to participate in the study when both Young Mania Rating Scale (YMRS) and Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) scores were  $\leq 7$  (Hamilton, 1960; Young et al., 1978).

Twenty five healthy controls without a history of psychiatric illness or history of psychiatric or neurologic disorders in first-degree relatives were enrolled at the Blood Bank from the same hospital. The groups were frequency-matched for age and sex. All participants were at least 18 years old. Exclusion criteria for both patients and controls included history of autoimmune diseases or chronic infection/inflammatory disorders, as well as any severe systemic disease or use of immune suppressive therapy.

### 2.2. Functionality assessment

All subjects were clinically interviewed by a trained psychiatrist and evaluated using the Functioning Assessment Short Test (FAST) (Cacilhas et al., 2009; Rosa et al., 2007) for the assessment of psychosocial functioning. The FAST is a valid and reliable instrument that evaluates functioning taking the last 15 days into account. It consists in an interview with 24 items that evaluates disability and includes items on autonomy, work, cognitive functioning, financial issues, and interpersonal relationships. This scale provides a total score of functioning and also 6 specific subscores. Items are rated using a 4-point scale: (0)= no difficulty, (1)= mild difficulty, (2)= moderate difficulty and (3)= severe difficulty. Total FAST scores range from 0 to 72 and higher scores indicates greater disability.

### 2.3. Purine levels analysis in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC)

Ten milliliters of peripheral blood were collected by venipuncture into an anticoagulant-free vacuum tube for each individual included in the study. Immediately after collection, blood samples were centrifuged at  $1000\times g$  for 10 min and the serum was aliquoted, labeled and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until assay testing.

The protocol was performed according to a method previously described (Voelter et al., 1980) with minor modifications. The denaturation of sample proteins was performed using 0.6 mol/L perchloric acid. All samples were then centrifuged ( $14,000\times g$  for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and the supernatants were neutralized with 4.0 N KOH and clarified with a second centrifugation ( $14,000\times g$  for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Aliquots of 20  $\mu\text{L}$  were applied to a reversed-phase HPLC system (Shimadzu, Japan) using a C18 column (Ultra C 18.25 cm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu\text{M}$ , Restek – USA). Elution was carried out applying a linear gradient from 100% of solvent A (60 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 5 mM of tetrabutylammonium phosphate, pH 6.0) to 100% of solvent B (solvent A plus 30% of methanol) over a 30 min period (flow rate at  $1.4\text{ mL min}^{-1}$ ). The retention time of standards was used as the parameter for identification and quantification. For the standards, adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid were obtained from Sigma Chemical CO. (ST. Louis, MO, USA) and individually prepared at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  to evaluate the retention time of each compound separately. Regarding the calibration curve, mixes containing all the compounds were prepared in different concentrations, from 1.56  $\mu\text{M}$  to 50  $\mu\text{M}$ . The individual standards and mixes were applied in 20  $\mu\text{L}$  aliquots along with the samples following the same protocol analysis cited above. The amounts of purines were measured by absorption at 260 nm. Purine concentrations (adenosine, inosine, xanthine, hypoxanthine and uric acid) are expressed as mg of the different compounds per dL of serum.

### 2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using PASW Statistics version 18.0. Descriptive statistics were used to report demographic and clinical characteristics of the sample. Normality of data distribution was assessed with Shapiro-Wilk's test and histogram visualization. Categorical variables were compared using chi-square test. Student's *t*-test was performed to compare parametric variables between bipolar disorder and controls. Correlations between continuous variables were assessed using Pearson's or Spearman's correlation test, when appropriate.

We used multiple linear regression to determine the effect of adenosine levels on functioning. To check for a possible threshold in patients, we created two groups. These were based on the median FAST scores in patients (25/26). Differences in purine levels between controls, patients with FAST scores  $< 25$ , and patients with FAST scores  $\geq 25$  were evaluated. In order to standardizing the purine results for better representation, we used the normalization by *z*-score. One-way ANOVA followed by Sidak post hoc test was used to compare parametric variables between control, FAST  $< 25$  and FAST  $\geq 25$  groups. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

Characteristics of patients with bipolar disorder and healthy controls are shown in Table 1.

Results of the purine levels are shown in Fig. 1. We found a significant decrease in blood serum adenosine levels in patients with bipolar disorder compared to matched controls ( $t = -4.8$ ,  $df = 43.96$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1a). There were no differences between patients and controls in inosine ( $t = -0.002$ ,  $df = 46$ ,  $p = 0.998$ ) (Fig. 1b), xanthine ( $t = -1.96$ ,  $df = 46$ ,  $p = 0.84$ ) (Fig. 1c), hypoxanthine ( $t = 1.26$ ,  $df = 47$ ,  $p = 0.21$ ) (Fig. 1d), and in uric acid levels ( $t = -0.47$ ,  $df = 48$ ,  $p = 0.63$ )

**Table 1**  
Characteristics of controls and patients with bipolar disorder.

Characteristic	Controls (n=25)	People with bipolar disorder (n=24)	p
Age (years) <sup>a,d</sup>	47.43 (12.47)	46.83 (7.21)	0.844
Gender (male/female) <sup>c</sup>	8/17	7/17	0.892
HDRS <sup>a,d</sup>	0.52 (1.07)	4.04 (2.07)	< 0.001
YMRS <sup>a,d</sup>	0.1 (0.43)	1.04 (1.6)	0.012
FAST <sup>a,d</sup>	5.57 (6.63)	23.78 (9.75)	< 0.001
Body mass index <sup>a,d</sup>	28.11 (5.24)	30.17 (5.93)	0.232
Smoking <sup>c</sup>	33.3%	25%	0.098
Years of education <sup>a,d</sup>	11.52 (3.99)	10.83 (3.95)	0.564
Age at illness onset <sup>a</sup>		26.26 (10.54)	
Length of euthymia (months) <sup>b</sup>		11 (34.43)	
Length of illness (years) <sup>a</sup>		20.54 (11.5)	
Number of manic/mixed episodes <sup>a</sup>		4.52 (5.1)	
Number of depressive episodes <sup>a</sup>		8.52 (8.39)	
Total number of episodes <sup>a</sup>		13.04 (11.72)	
Number of hospitalizations <sup>a</sup>		5 (8.32)	
<b>Comorbidities</b>			
Hypothyroidism <sup>c</sup>	4%	41.66%	0.007
Hypertension <sup>c</sup>	12%	25%	0.034
Diabetes mellitus <sup>c</sup>	0%	20.83%	0.023
Dyslipidemia <sup>c</sup>	3.8%	29.16%	0.086
Obesity <sup>c</sup>	0%	4.17%	0.334
Other <sup>c</sup>	7.7%	33.33%	0.07
<b>Medications</b>			
Classical mood stabilizers		66.6%	
Lithium		37.5%	
Valproate		25%	
Carbamazepine		8.3%	
Lamotrigine		4.2%	
Antidepressants		4.16%	
Atypical antipsychotics		33.3%	
Typical antipsychotics		12.5%	
Benzodiazepines		8.33%	

HDRS (Hamilton Depression Rating Scale); YMRS (Young Mania Ratio Scale); FAST (Functioning Assessment Short Test).

<sup>a</sup> Mean (standard deviation).

<sup>b</sup> Median (interquartile range).

<sup>c</sup> Chi-square test.

<sup>d</sup> Student's *t*-test.

(Fig. 1e).

A significant negative correlation was found between adenosine levels and HDRS scores in patients ( $r = -0.642$ ,  $p = 0.001$ ) (Fig. 2a). Likewise, a significant negative correlation was found between adenosine levels and FAST score in patients ( $\rho = -0.551$ ,  $p = 0.008$ ), but no differences were found in adenosine levels and FAST score in controls ( $\rho = -0.089$ ,  $p = 0.939$ ) (Fig. 2b). No difference was observed in the analysis of inosine, xanthine, hypoxanthine, uric acid and the HDRS and FAST scales, as well no difference was found between any purine and the YMRS scale (data not shown).

When dichotomized by the FAST scores, we found a significant difference in adenosine levels between the patients with a FAST < 25 and the control group [ $F(2, 46) = 14.52$ ,  $p = 0.013$ ], as well as a significant difference between patients with a FAST  $\geq 25$  and the control group [ $F(2, 46) = 14.52$ ,  $p < 0.001$ ]. The comparison between patients with a FAST < 25 and FAST  $\geq 25$  for adenosine levels was not significant [ $F(2, 46) = 14.52$ ,  $p = 0.078$ ]. There were no differences between FAST scores and other purines (Fig. 3).

#### 4. Discussion

Our data shows a decrease in serum adenosine levels in euthymic

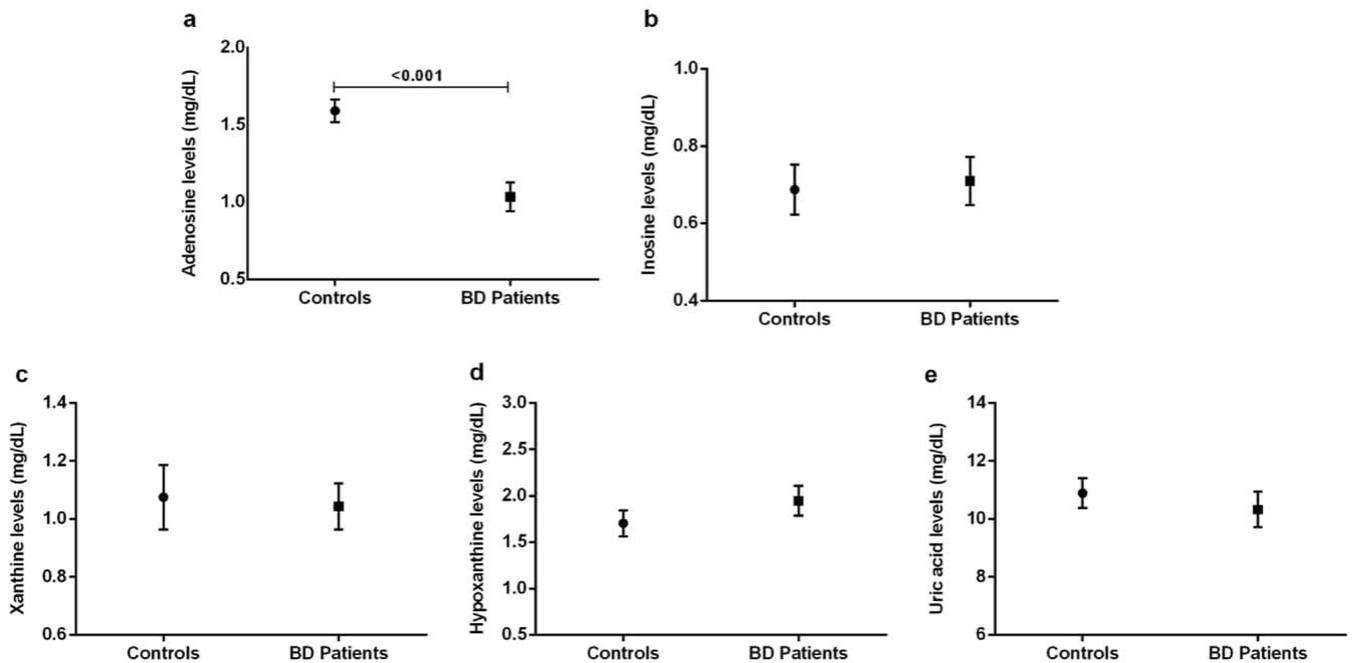
bipolar disorder patients compared with healthy controls, as well as a significant negative correlation between adenosine levels and depression scale scores among patients. Interestingly, we found that higher functioning impairment was linked to lower levels of adenosine in patients, which could indicate an association between adenosine levels and functioning in bipolar disorder.

Decreased serum adenosine levels in bipolar disorder compared with controls indicates a systemic reduction of a neuroprotective agent. One mechanism of adenosine neuroprotection is via a reduction of microglia and macrophages activation (central and peripheral action), thereby reducing pro-inflammatory cytokines, chemokines and nitric oxide (Bischofberger et al., 1997; Cronstein, 1994) besides potentially inhibiting TNF- $\alpha$  production (Le Vraux et al., 1993; Schubert et al., 1997). Likewise, a pro-inflammatory profile is well accepted as an important part of bipolar disorder pathophysiology (Jakobsson et al., 2015; Réus et al., 2015), including the presence of microglial activation (Stertz et al., 2013) and increased TNF- $\alpha$  production (Munkholm et al., 2013). In this sense, our results contribute to the understanding of the establishment of this inflammatory profile in this illness.

In consonance with our findings, the use of adenosine modulators has been suggested as a possible adjunctive treatment for bipolar disorder. Allopurinol is a particularly promising modulator originally used for the treatment of gout and hyperuricemia. This drug inhibits xanthine oxidase, a key enzyme in purine degradation, and it is suggested to increase brain adenosine levels (Pacher et al., 2006). It has been reported that allopurinol is effective in treating acute mania when used adjunctively with lithium (Machado-Vieira et al., 2008) and with valproate (Jahangard et al., 2014), albeit this effect was not found in all studies (Fan et al., 2012; Weiser et al., 2014).

Furthermore, previous basic studies corroborate the hypothesis of adenosinergic involvement in mood disorders. Adenosine  $A_{2A}$  receptor agonism was able to decrease the amphetamine-induced motor activity and behavioral unrest in animal models of mania (reviewed in Fredholm et al. (2005)), suggesting an important role of adenosine in bipolar mania. In this same vein, adenosine administration produced an antidepressant-like effect in mice, probably mediated through an interaction with  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors (Kaster et al., 2004), complementing a possible role for adenosine also in depression. Moreover, lithium treatment has been shown to alter ectonucleotidase activities in zebrafish, which may regulate extracellular nucleotide and nucleoside levels (Oliveira et al., 2011; Wilot et al., 2004). Likewise, the administration of the antidepressant citalopram to patients with major depression was followed by an increase in plasma adenosine levels (Bardi et al., 2005). Similarly, an increase in the adenosine deaminase levels, was reported in patients with major depression after 8 weeks of antidepressant treatment. The authors suggest that the activity of this enzyme can be used to monitor the effects of the antidepressant treatment (Herken et al., 2007). Adenosine seems to be a promising target not only to bipolar disorder but also for mood disorder in general.

In addition, our subanalysis show that adenosine levels conversely correlated with depression scores. Although the patients of the present study are euthymic and had only been recruited with Hamilton Depression Rating Scale scores  $\leq 7$ , we had observed that they, even stabilized, have higher scores compared to healthy subjects. Considering all factors measured by this scale, we can better understand how even stabilized, patients have higher scores than controls, as some features should be intrinsic to the diagnosis (American Psychiatric Association, 2013). Similarly, we corroborate previous studies that observed higher functioning impairment in remitted bipolar patients in comparison with controls (Rosa et al., 2008), with a scale widely used for determination of impairment in psychosocial functionality (Rosa et al., 2008, 2010; Vázquez et al., 2011). We also demonstrated that adenosine levels conversely correlated with functioning scores in patients and further, when we dichotomized patients between low impairment (FAST < 25) and high impairment (FAST



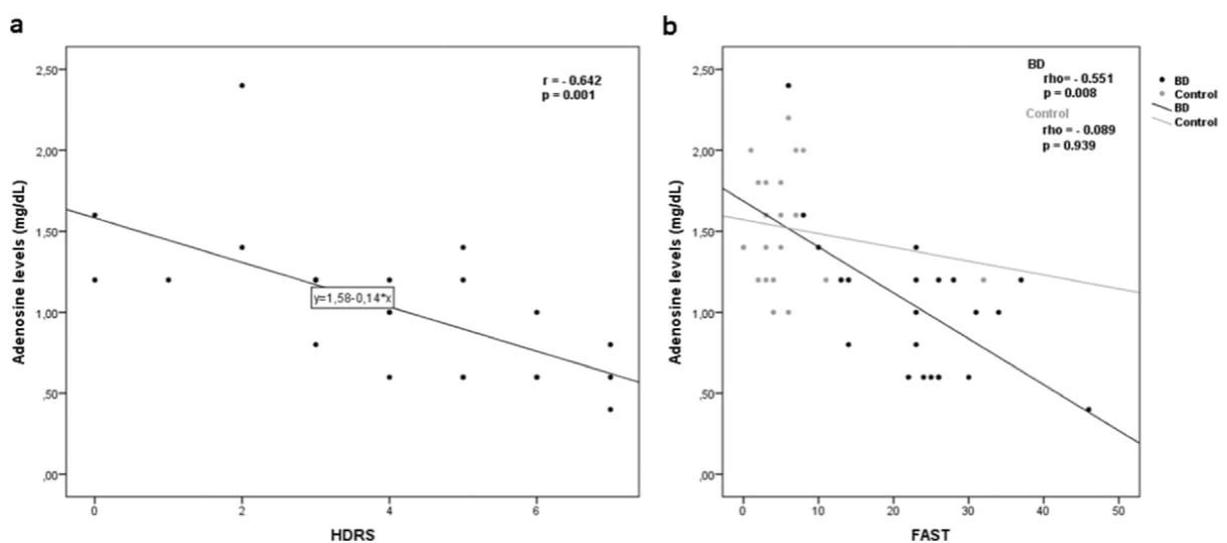
**Fig. 1.** Blood serum purine levels (mg/dL) by high pressure liquid chromatography (HPLC) in controls and people with bipolar disorder. (a) Adenosine levels. (b) Inosine levels. (c) Xanthine levels. (d) Hypoxanthine levels. (e) Uric acid levels. Student's *t*-test.

$\geq 25$ ) in comparison with controls for the purine levels, we observe even lower adenosine levels in the high impairment group. In this sense, our results indicate a relationship between adenosine levels and the functional impairment caused by the disorder, which could demonstrate a potential relation of adenosine levels in worsening of symptoms. How the purinergic system fits into the wider net of dysfunctional pathophysiological loops has not been explored, in this case, more studies are needed.

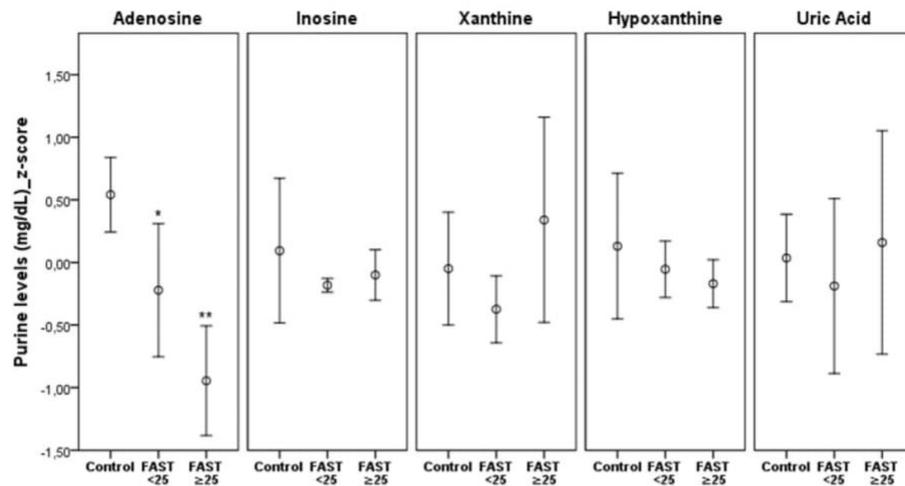
No statistical difference between the adenosine metabolites: inosine, xanthine, hypoxanthine and uric acid was found between patients and controls. Up to our knowledge, none of these purines had been previously evaluated in patients with bipolar disorder, except the uric acid, what is even considered for some groups as a specific state marker of bipolar disorder mania (Machado-Vieira, 2012). Higher plasma uric acid levels during the manic phase of bipolar disorder have been demonstrated, but not during the depressive or euthymic phase (De Berardis et al., 2008); moreover, uric acid levels correlated with

YMRS scores, suggesting a role in the pathophysiology of mania. Similarly, a significant association between improvement in manic symptoms and a decrease in plasma uric acid levels has been described (Machado-Vieira et al., 2008). On the other hand, recent studies did not find a correlation between uric acid levels and YMRS scores (Albert et al., 2015; Salvadore et al., 2010). Our results corroborate the studies, which no difference between uric acid levels in euthymic bipolar disorder and controls was found (De Berardis et al., 2008). Therefore, we consider that more studies are required to determine uric acid as a specific state marker of bipolar disorder mania.

Our results should be interpreted in light of their limitations. We had a small number of subjects included. The patients enrolled for the study were all on medication and that might have had an impact on the parameters analyzed. Specifically, though, the medications habitually prescribed for bipolar disorder increase adenosine levels, an effect that can be further confounded by remission status (Blardi et al., 2005). More specifically, we have previously shown that chronic treatment



**Fig. 2.** Correlations between adenosine levels and clinical scales. (a) Correlation between people with bipolar disorder adenosine levels and Hamilton Depression Rating Scale (HDRS). Pearson's correlation test. (b) Correlation between adenosine levels of people with bipolar disorder and controls with the Functioning Assessment Short Test (FAST). Spearman's correlation test.



**Fig. 3.** Differences in purine levels (mg/dL after normalization by z-score) among controls, patients with low functioning impairment (FAST scores <25) and patients with high functioning impairment (FAST scores ≥25). \* $p = 0.013$  for difference between FAST <25 and control group for adenosine levels. \*\* $p < 0.001$  for difference between FAST ≥25 and control group.  $p = 0.078$  for comparison between FAST <25 and FAST ≥25 for adenosine levels. One-way ANOVA followed by Sidak post hoc test. FAST: Functioning Assessment Short Test.

with lithium promoted an enhancement of ATP and AMP hydrolysis in synaptosomes from the hippocampus of rats (Wilot et al., 2004). We observed significant increase in some comorbidities in patients in comparison with controls, which could interfere in our results. However, in the hyperthyroidism animal model it was demonstrated an increase in the enzyme 5'-nucleotidase activity (Baldissarelli et al., 2016), what could increase adenosine levels in patients. In addition, although caffeine increases plasma adenosine concentration in a dose related manner (Conlay et al., 1997), we did not control for this variable. Moreover, even though we used blood and the best tissue for the investigation of psychiatric disorders is thought to be the brain, there are reports confirming that peripheral results can be informative of the CNS (Mutisya et al., 1994; Parker et al., 1990), including with the purinergic system (Bowman et al., 2010). Previous works already demonstrated a significant increase in CSF/serum albumin ratio, which represent a blood–brain barrier disfunction in BD patients (Zetterberg et al., 2014). On this regard, peripheral analysis provides information on the individual systemic milieu, which is very useful for psychiatric disorders that are being increasingly considered systemic disorders (Kapczinski et al., 2010).

Taken together, our results provide evidence for a purinergic imbalance in bipolar disorder, specifically an adenosinergic dysfunction. Interestingly, our results also indicate a relationship between adenosine levels and the functional impairment caused by the disorder, which could demonstrate a potential relation of peripheral adenosine levels in worsening of symptoms.

#### Author disclosure

Dr Battastini has received grant/research from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), number 303264-2013-6. Dr Kapczinski has received grant/research support from CNPq, number 573671-2008-7.

#### Funding

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

#### Contributors

CG, GRF, AMOB and PVSM designed the study; MPV, BTMQS, JS and AF screened the study participants; CG and CEJM performed the experimental analyses; CG and PVSM undertook the statistical analy-

sis; CG, GRF, AMOB, MK, FK and PVSM interpreted the results; CG, AMOB and PVSM supervised the data analysis and writing of the paper, which was revised and approved by all authors.

#### Conflict of interest

All other authors declare no possible conflicts of interest, financial or otherwise, or grants or other forms of financial support.

#### Acknowledgement

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa–Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and CNPq: National Science and Technology Institute for Translational Medicine and Research Fellowship. The funding agencies did not have any role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or manuscript preparation. C. Gubert was supported by a doctoral scholarship from CAPES and CNPq.

#### References

- American Psychiatric Association, 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC.
- Albert, U., De Cori, D., Aguglia, A., Barbaro, F., Bogetto, F., Maina, G., 2015. Increased uric acid levels in bipolar disorder subjects during different phases of illness. *J. Affect. Disord.* 173, 170–175.
- Baldissarelli, J., Santi, A., Schmatz, R., Abdalla, F.H., Cardoso, A.M., Martins, C.C., Dias, G.R., Calgaroto, N.S., Pelinson, L.P., Reichert, K.P., Loro, V.L., Morsch, V.M., Schetinger, M.R., 2016. Hypothyroidism enhanced ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in rat synaptosomes can be prevented by the naturally occurring polyphenol quercetin. *Cell. Mol. Neurobiol.*
- Berk, M., Kapczinski, F., Andreazza, A.C., Dean, O.M., Giorlando, F., Maes, M., Yücel, M., Gama, C.S., Dodd, S., Dean, B., Magalhães, P.V., Amminger, P., McGorry, P., Malhi, G.S., 2011. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (3), 804–817.
- Bischofberger, N., Jacobson, K.A., von Lubitz, D.K., 1997. Adenosine A1 receptor agonists as clinically viable agents for treatment of ischemic brain disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 825, 23–29.
- Blardi, P., de Lalla, A., Urso, R., Auteri, A., Dell'Erba, A., Bossini, L., Castrogiovanni, P., 2005. Activity of citalopram on adenosine and serotonin circulating levels in depressed patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* 25 (3), 262–266.
- Boison, D., 2008. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8 (1), 2–7.
- Bowman, G.L., Shannon, J., Frei, B., Kaye, J.A., Quinn, J.F., 2010. Uric acid as a CNS antioxidant. *J. Alzheimers Dis.* 19 (4), 1331–1336.
- Burnstock, G., 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (7), 575–590.
- Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M.P., Illes, P., 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 95 (2), 229–274.
- Cacilhas, A.A., Magalhães, P.V., Ceresér, K.M., Walz, J.C., Weyne, F., Rosa, A.R., Vieta,

- E., Kapczinski, F., 2009. Validity of a short functioning test (FAST) in Brazilian outpatients with bipolar disorder. *Value Health* 12 (4), 624–627.
- Cekic, C., Linden, J., 2016. Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 16 (3), 177–192.
- Conlay, L.A., Conant, J.A., deBros, F., Wurtman, R., 1997. Caffeine alters plasma adenosine levels. *Nature* 389 (6647), 136.
- Cronstein, B.N., 1994. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* 76 (1), 5–13.
- De Berardis, D., Conti, C.M., Campanella, D., Carano, A., Di Giuseppe, B., Valchera, A., Tancredi, L., Serroni, N., Pizzorno, A.M., Fulcheri, M., Gambi, F., Sepede, G., Moschetti, F.S., Salerno, R.M., Ferro, F.M., 2008. Evaluation of plasma antioxidant levels during different phases of illness in adult patients with bipolar disorder. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 22 (3), 195–200.
- Fan, A., Berg, A., Bresee, C., Glassman, L.H., Rapaport, M.H., 2012. Allopurinol augmentation in the outpatient treatment of bipolar mania: a pilot study. *Bipolar Disord.* 14 (2), 206–210.
- Fredholm, B.B., Chen, J.F., Masino, S.A., Vaugeois, J.M., 2005. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 385–412.
- Grande, I., Berk, M., Birmaher, B., Vieta, E., 2016. Bipolar disorder. *Lancet* 387 (10027), 1561–1572.
- Gubert, C., Fries, G.R., Pfaffenseller, B., Ferrari, P., Coutinho-Silva, R., Morrone, F.B., Kapczinski, F., Battastini, A.M., 2014. Role of P2×7 receptor in an animal model of mania induced by D-amphetamine. *Mol. Neurobiol.*
- Hamilton, M., 1960. A rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 23, 56–62.
- Haskó, G., Szabó, C., Németh, Z.H., Kvetan, V., Pastores, S.M., Vizi, E.S., 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* 157 (10), 4634–4640.
- Herken, H., Gurel, A., Sele, S., Armutcu, F., Ozen, M.E., Bulut, M., Kap, O., Yumru, M., Savas, H.A., Akyol, O., 2007. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch. Med. Res.* 38 (2), 247–252.
- Jahangard, L., Soroush, S., Haghghi, M., Ghaleiha, A., Bajoghli, H., Holsboer-Trachsler, E., Brand, S., 2014. In a double-blind, randomized and placebo-controlled trial, adjunctive allopurinol improved symptoms of mania in in-patients suffering from bipolar disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24 (8), 1210–1221.
- Jakobsson, J., Bjerke, M., Sahebi, S., Isgren, A., Ekman, C.J., Sellgren, C., Olsson, B., Zetterberg, H., Blennow, K., Pålsson, E., Landén, M., 2015. Monocyte and microglial activation in patients with mood-stabilized bipolar disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 40 (4), 250–258.
- Kapczinski, F., Dal-Pizzol, F., Teixeira, A.L., Magalhães, P.V., Kauer-Sant'Anna, M., Klamt, F., Pasquali, M.A., Quevedo, J., Gama, C.S., Post, R., 2010. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Mol. Psychiatry* 15 (8), 784–786.
- Kapczinski, F., Magalhães, P.V., Balanzá-Martínez, V., Dias, V.V., Frangou, S., Gama, C.S., Gonzalez-Pinto, A., Grande, I., Ha, K., Kauer-Sant'Anna, M., Kunz, M., Kupka, R., Leboyer, M., Lopez-Jaramillo, C., Post, R.M., Rybakowski, J.K., Scott, J., Strejilevich, S., Tohen, M., Vazquez, G., Yatham, L., Vieta, E., Berk, M., 2014. Staging systems in bipolar disorder: an international society for Bipolar Disorders Task Force report. *Acta Psychiatr. Scand.* 130 (5), 354–363.
- Kapczinski, F., Streb, L.G., 2014. Neuroprogression and staging in psychiatry: historical considerations. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 36 (3), 187–188.
- Kaster, M.P., Rosa, A.O., Rosso, M.M., Goulart, E.C., Santos, A.R., Rodrigues, A.L., 2004. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. *Neurosci. Lett.* 355 (1–2), 21–24.
- Kim, Y.K., Jung, H.G., Myint, A.M., Kim, H., Park, S.H., 2007. Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 104 (1–3), 91–95.
- Krügel, U., 2016. Purinergic receptors in psychiatric disorders. *Neuropharmacology* 104, 212–225.
- Kupfer, D.J., 2005. The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA* 293 (20), 2528–2530.
- Lara, D.R., Dall'Igna, O.P., Ghisolfi, E.S., Brunstein, M.G., 2006. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30 (4), 617–629.
- Le Vraux, V., Chen, Y.L., Masson, I., De Sousa, M., Giroud, J.P., Florentin, I., Chauvelot-Moachon, L., 1993. Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists. *Life Sci.* 52 (24), 1917–1924.
- Machado-Vieira, R., 2012. Purinergic system in the treatment of bipolar disorder: uric acid levels as a screening test in mania. *J. Clin. Psychopharmacol.* 32 (5), 735–736.
- Machado-Vieira, R., Soares, J.C., Lara, D.R., Luckenbaugh, D.A., Busnello, J.V., Marca, G., Cunha, A., Souza, D.O., Zarate, C.A., Kapczinski, F., 2008. A double-blind, randomized, placebo-controlled 4-week study on the efficacy and safety of the purinergic agents allopurinol and dipyrindamole adjunctive to lithium in acute bipolar mania. *J. Clin. Psychiatry* 69 (8), 1237–1245.
- Martinez-Aran, A., Vieta, E., Torrent, C., Sanchez-Moreno, J., Goikolea, J.M., Salamero, M., Malhi, G.S., Gonzalez-Pinto, A., Daban, C., Alvarez-Grandi, S., Fountoulakis, K., Kaprinis, G., Tabares-Seisdedos, R., Ayuso-Mateos, J.L., 2007. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar Disord.* 9 (1–2), 103–113.
- Montes, G.C., Hammes, N., da Rocha, M.D., Montagnoli, T.L., Fraga, C.A., Barreiro, E.J., Sudo, R.T., Zapata-Sudo, G., 2016. Treatment with adenosine receptor agonist ameliorates pain induced by acute and chronic inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 358 (2), 315–323.
- Munkholm, K., Brauner, J.V., Kessing, L.V., Vinberg, M., 2013. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: a systematic review and meta-analysis. *J. Psychiatr. Res.* 47 (9), 1119–1133.
- Mutisya, E.M., Bowling, A.C., Beal, M.F., 1994. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 63 (6), 2179–2184.
- Oliveira, R.L., Seibt, K.J., Rico, E.P., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2011. Inhibitory effect of lithium on nucleotide hydrolysis and acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neurotoxicol. Teratol.* 33 (6), 651–657.
- Ortiz, R., Ulrich, H., Zarate, C.A., Machado-Vieira, R., 2015. Purinergic system dysfunction in mood disorders: a key target for developing improved therapeutics. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 57, 117–131.
- Ortiz-Domínguez, A., Hernández, M.E., Berlanga, C., Gutiérrez-Mora, D., Moreno, J., Heinze, G., Pavón, L., 2007. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord.* 9 (6), 596–602.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabó, C., 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.* 58 (1), 87–114.
- Parker, W.D., Filley, C.M., Parks, J.K., 1990. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40 (8), 1302–1303.
- Pfaffenseller, B., Fries, G.R., Wollenhaupt-Aguiar, B., Colpo, G.D., Stertz, L., Panizzutti, B., Magalhães, P.V., Kapczinski, F., 2013. Neurotrophins, inflammation and oxidative stress as illness activity biomarkers in bipolar disorder. *Expert Rev. Neurother.* 13 (7), 827–842.
- Rao, J.S., Harry, G.J., Rapoport, S.I., Kim, H.W., 2010. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. *Mol. Psychiatry* 15 (4), 384–392.
- Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M., de Mendonça, A., 2003. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect.* 16 (2), 80–86.
- Rosa, A.R., Franco, C., Martínez-Aran, A., Sánchez-Moreno, J., Reinares, M., Salamero, M., Arango, C., Ayuso-Mateos, J.L., Kapczinski, F., Vieta, E., 2008. Functional impairment in patients with remitted bipolar disorder. *Psychother. Psychosom.* 77 (6), 390–392.
- Rosa, A.R., Reinares, M., Michalak, E.E., Bonnin, C.M., Sole, B., Franco, C., Comes, M., Torrent, C., Kapczinski, F., Vieta, E., 2010. Functional impairment and disability across mood states in bipolar disorder. *Value Health* 13 (8), 984–988.
- Rosa, A.R., Sánchez-Moreno, J., Martínez-Aran, A., Salamero, M., Torrent, C., Reinares, M., Comes, M., Colom, F., Van Riel, W., Ayuso-Mateos, J.L., Kapczinski, F., Vieta, E., 2007. Validity and reliability of the Functioning Assessment Short Test (FAST) in bipolar disorder. *Clin. Pract. Epidemiol. Ment. Health* 3, 5.
- Roshanaei-Moghaddam, B., Katon, W., 2009. Premature mortality from general medical illnesses among persons with bipolar disorder: a review. *Psychiatr. Serv.* 60 (2), 147–156.
- Réus, G.Z., Fries, G.R., Stertz, L., Badawy, M., Passos, I.C., Barichello, T., Kapczinski, F., Quevedo, J., 2015. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience* 300, 141–154.
- Sajjadi, F.G., Takabayashi, K., Foster, A.C., Domingo, R.C., Firestein, G.S., 1996. Inhibition of TNF- $\alpha$  expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J. Immunol.* 156 (9), 3435–3442.
- Salvadore, G., Viale, C.I., Luckenbaugh, D.A., Zanatto, V.C., Portela, L.V., Souza, D.O., Zarate, C.A., Machado-Vieira, R., 2010. Increased uric acid levels in drug-naïve subjects with bipolar disorder during a first manic episode. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34 (6), 819–821.
- Schubert, P., Ogata, T., Marchini, C., Ferroni, S., Rudolph, K., 1997. Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 825, 1–10.
- Stertz, L., Magalhães, P.V., Kapczinski, F., 2013. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr. Opin. Psychiatry* 26 (1), 19–26.
- Voelter, W., Zech, K., Arnold, P., Ludwig, G., 1980. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chromatogr.* 199, 345–354.
- Vázquez, G.H., Kapczinski, F., Magalhães, P.V., Córdoba, R., Lopez Jaramillo, C., Rosa, A.R., Sanchez de Carmona, M., Tohen, M., group, I.-A.N.o.B.D. 2011. Stigma and functioning in patients with bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 130 (1–2), 323–327.
- Weiser, M., Burshtein, S., Gershon, A.A., Marian, G., Vlad, N., Grecu, I.G., Tocari, E., Tiugan, A., Hotineanu, M., Davis, J.M., 2014. Allopurinol for mania: a randomized trial of allopurinol versus placebo as add-on treatment to mood stabilizers and/or antipsychotic agents in manic patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 16 (4), 441–447.
- Wilot, L.C., Da Silva, R.S., Ferreira, O.J., Bonan, C.D., Sarkis, J.J., Rocha, E., Battastini, A.M., 2004. Chronic treatment with lithium increases the ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 368 (2), 167–170.
- Young, R.C., Biggs, J.T., Ziegler, V.E., Meyer, D.A., 1978. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br. J. Psychiatry* 133, 429–435.
- Zetterberg, H., Jakobsson, J., Redsäter, M., Andreasson, U., Pålsson, E., Ekman, C.J., Sellgren, C., Johansson, A.G., Blennow, K., Landén, M., 2014. Blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction in patients with bipolar disorder in relation to antipsychotic treatment. *Psychiatry Res.* 217 (3), 143–146.

## **Capítulo 2**

### **Bipolar Disorder and the 1513A>C P2RX7 polymorphism frequency**

Carolina Gubert, Roberta Andrejew, Cesar Eduardo Jacintho Moritz, Fabricia Dietrich, Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno, Bárbara Tietböhl Martins Quadros dos Santos, Juliana Sartori, Adam Fijtman, Márcia Kauer-Sant'Anna, Flávio Kapczinski, Pedro Vieira da Silva Magalhães, Ana Maria Oliveira Battastini

Periódico: **Journal of Psychiatric Research**

Status: **Submetido**

## **Bipolar Disorder and the 1513A>C P2RX7 polymorphism frequency**

Carolina Gubert<sup>a</sup>, Roberta Andrejew<sup>a</sup>, Cesar Eduardo Jacintho Moritz<sup>b</sup>, Fabricia Dietrich<sup>a</sup>, Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno<sup>c,d,e</sup>, Bárbara Tietböhl Martins Quadros dos Santos<sup>c,d,e</sup>, Adam Fijtman<sup>c,d,e</sup>, Márcia Kauer-Sant'Anna<sup>c,d,e</sup>, Flávio Kapczinski<sup>c,d,e,f</sup>, Pedro Vieira da Silva Magalhães<sup>c,d,e,f\*</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Bipolar Disorder Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> INCT of Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-903 RS, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal Rio Grande do Sul, 90035-903 RS, Brazil

<sup>f</sup> Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, MacMaster University, Hamilton, Canada

### **\* Both are corresponding authors:**

\*Ana Maria Oliveira Battastini, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel: +55 (51) 3308.5554, Fax: +55 (51) 3308.5535, E-mail: [abattastini@gmail.com](mailto:abattastini@gmail.com)

\*Pedro Vieira da Silva Magalhães, Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: +55 (51) 3359.8845, Fax: +55 (51) 3359.8846, E-mail: [pedromaga2@gmail.com](mailto:pedromaga2@gmail.com)

## Abstract

Although the etiology of Bipolar Disorder (BD) remain unknown, a strong genetic component to the pathogenesis and risk for this disorder has been widely explored. Several risk genes for BD have been identified; the purinergic P2X7 receptor (P2X7R) is considered a pro-inflammatory receptor and represents a potential candidate. The purpose of the present study was to assess the frequency of the 1513A>C *P2RX7* polymorphism (rs3751143; Glu496Ala), which leads to receptor loss-of-function, in 154 BD patients versus 184 control subjects and further verify if exists a differential modulation of P2X7R in 22 euthymic BD patients in comparison to 18 healthy controls. Our data show a decrease in 1513C allele frequency ( $p = 0.045$ ) and a potential increase in 1513AA ( $p = 0.113$ ) and 1513AA/AC ( $p = 0.055$ ) genotype frequency in BD patients compared to controls, which indicates an enhanced function of the pro-inflammatory P2X7 receptor in BD subjects. On the other hand, no difference between euthymic BD patients and matched healthy controls in regard to *P2RX7* gene and P2X7R protein expression or serum ATP levels were found. Above all, our results points out the P2X7R as a possible important mediator involved in the pathophysiology of BD. Further molecular studies are necessary to clarify the potential involvement of P2X7R and of 1513A>C *P2RX7* polymorphism in the etiology of BD.

**Key words: Bipolar Disorder, P2X7R, *P2RX7*, Polymorphism, rs3751143, 1513A>C, Glu496Ala**

## Introduction

Bipolar disorder (BD) is a severe and chronic psychiatric disorder that affects approximately 1-4 % of the world population (Grande et al., 2016). It is associated with a significant morbidity and mortality, with high rates of suicides and medical comorbidities (Crump et al., 2013). Although the etiology of BD remains unknown (Bobo, 2017), a strong genetic component to the pathogenesis and risk for this disorder has been widely explored (Walker et al., 2015). The heritability of BD ranges from 73% to 93%, and first-degree biological relatives of patients with BD have a 7-fold increased risk of developing the disorder compared to the general population (Lichtenstein et al., 2009, Barnett and Smoller, 2009). Several risk genes for BD have been identified (Goes, 2016), one stands out to compose the pathophysiology of BD: the *P2RX7* gene (Backlund et al., 2011).

The purinergic P2X7 receptor (P2X7R) is encoded by the *P2RX7* gene and is an adenosine 5'- triphosphate (ATP)-binding ligand-gated cation channel (Coddou et al., 2011). It has a wide tissue distribution, being expressed by virtually all cell types, including neuronal and glial cells (Sperlágh et al., 2006). Activation of this receptor by brief exposure to extracellular ATP opens the cation-selective channel, which allows  $\text{Ca}^{2+}$  influx, as well as  $\text{K}^{+}$  efflux. When overactivated by ATP, the P2X7R channel dilates to a non-selective plasma membrane pore permeable to aqueous solutes up to 900 Da engaging the proinflammatory cascade and cell death (Solle et al., 2001). Therefore, it contributes to neuroinflammation closely related to pain (North and Jarvis, 2013), neurodegenerative disorders such as Alzheimer's (Diaz-Hernandez et al., 2012) and mood disorders (Iwata et al., 2013).

Additionally, the *P2RX7* gene is highly polymorphic (Roger et al., 2010) and is localized on chromosome 12q24, considered a locus of susceptibility to BD (Barden et al., 2006). Non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNP's) of *P2RX7* have been related to mood disorders, mainly the *P2RX7* SNP's 1405A>G (rs2230912) and 1068G>A (rs1718119) with incongruent results and no definitive associations (Caseley et al., 2014, Xu et al., 2017).

Recently, attention has been focused on a *P2RX7* SNP, the 1513A>C polymorphism (rs3751143) which converts glutamic acid to an alanine acid at residue 496 (Glu496Ala or E496A) in the carboxyl-terminal cytoplasmic tail of the receptor (Sanz et al., 2014). It was demonstrated that this substitution causes in heterozygosis (AC) a 50% decrease in P2X7R responses and in homozygosis (CC) to an almost complete loss of function of the P2X7R (Gu et al., 2001, Roger et al., 2010). No study so far has determined a link between this 1513A>C SNP with BD.

The purpose of the present study was to assess the frequency of 1513A>C *P2RX7* SNP in BD patients versus control subjects, and further to verify if exist a differential modulation of P2X7R in euthymic BD patients in comparison to healthy controls.

## **Methods**

### *Subjects*

The present study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. All procedures were performed in accordance with the ethical standards set forth in the Declaration of Helsinki. Moreover, all subjects provided written informed consent after receiving a complete description of the study before their inclusion. For the polymorphism analysis, 154 chronic treated patients with bipolar disorder type I were recruited and 184 healthy controls were enrolled. For the second set of experiments, 22 chronic treated euthymic patients with bipolar disorder type I and 18 healthy controls matched by age and sex were enrolled.

Patients are from the Bipolar Disorders Program (PROTAHBI), an outpatient program of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Patients with bipolar disorder were diagnosed according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition (DSM-5) criteria (Psychiatric and Association, 2013). Patients were considered euthymic, when both Young Mania Rating Scale (YMRS) and Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) scores were  $\leq 7$  (HAMILTON, 1960, Young et al., 1978). Healthy controls were enrolled at the Blood Bank from the same hospital and were considered subjects without a history of psychiatric illness or history of psychiatric or neurologic disorders in first-degree relatives. All participants were at least 18 years old. Exclusion criteria for both patients and controls included history of autoimmune diseases or chronic infection/inflammatory disorders, as well as any severe systemic disease or use of immune suppressive therapy.

For the polymorphism analysis, 10mL of peripheral blood were collected by venipuncture into an anticoagulant-free vacuum tube for each 338 individuals included

in the study. Finally, for the second set of experiments, 10mL of peripheral blood were collected from the 40 participants by venipuncture into an anticoagulant-free and into a heparinized vacuum tube. Immediately after collection, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from total heparinized blood by Ficoll-Paque density-gradient centrifugation (GE Healthcare) and total blood samples were centrifuged at 1,000 x g for 10 min for serum separation.

*P2RX7 (SNP 1513A>C) polymorphism analysis*

Genomic DNA was extracted from total blood, using the Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. USA). 1513A>C SNP was analyzed in genomic DNA samples with the TaqMan® MGB probe technique as previously described with few modifications (Cabrini et al., 2005). Briefly, 10 ng of genomic DNA were added to the TaqMan® Universal Master Mix I in a final volume of 10µL. Allele-specific hybridization was detected in real time with an StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) during 50 amplification cycles at 95 and 60°C. The TaqMan MGB probes and primer oligonucleotide sequences are: Probe (SNP 1513AC) - 1513A VIC-TGGAGGAGCTGTGC-NFQ-MGB; 1513C FAM-CTGGAGGCGCTGTG-NFQ-MGB and Primer (SNP 1513AC) - Forward AGCTGCCTCCCATCTCAACTC; Reverse AGCTCTGAGGTGGTGATGCA. Genotype was finally assigned by allelic discrimination with analysis of the fluorescent signal both during and at the end of the template amplification.

### *P2RX7 mRNA analysis*

The *P2RX7* mRNA expression was performed in PBMCs. Total RNA was isolated using the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem), according to the manufacturers' instructions. The newly synthesized complementary DNA (cDNA) was then amplified by real-time polymerase chain reaction (PCR) performed on the StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA) using the following primers: *P2RX7* (Hs00175721-M1; Applied Biosystems) and *GAPDH* (4326317E) (Applied Biosystems). All results were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak et al., 1995).

### *P2X7R protein measurement*

For P2X7R protein analysis, 15 µg of cell lysate total protein from PBMCs, were separated by electrophoresis, followed by transfer onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After blocking, membranes were incubated with the primary polyclonal antibody against P2X7R (1:500, Alomone Labs) or with the anti-β-actin antibody (1:1000, Cell Signaling) and with secondary anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (1:1000, Cell Signaling). Signals were visualized using ECL detection reagent (Millipore) and monitored using the ImageQuant™ LAS 400 (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA). Densitometry analysis of the protein bands was performed with ImageJ software. Band density was normalized over the β-actin band.

### *ATP levels determination*

The assessment of ATP levels, the P2X7R-ligand, in serum was performed by high pressure liquid chromatography (HPLC) as previously described (Gubert et al., 2016b). ATP levels are expressed as mg per dL of serum.

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using PASW Statistics version 20.0. Descriptive statistics were used to report demographic and clinical characteristics of the sample. Normality of data distribution was assessed with Shapiro-Wilk's test and histogram visualization. Categorical variables were compared using Fisher's exact and Chi-square tests followed by Column Proportions Post Hoc test. To compare parametric and nonparametric variables between BD patients and controls, Student's t-test and Mann Whitney were performed respectively. Correlations between continuous variables were assessed using Pearson's or Spearman's correlation test, when appropriate. Significance was assumed for  $p < 0.05$ .

### **Results**

Baseline characteristics of 184 patients with bipolar disorder and 154 healthy controls recruited for the polymorphism analysis are shown in **Table 1**. The *P2RX7* polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium in both control and BD populations

(1513A>C: controls  $\chi^2$ : 0.27,  $p = 0.6$ ; BD patients  $\chi^2$ : 0.1,  $p = 0.75$ ). The frequencies of 1513A>C SNP from control subjects and BD patients are also described in **Table 1** and we can observe a significant decrease of 1513C allele frequency in patients in comparison with controls ( $p = 0.045$ ). We also found a non-significant increase of 1513AA genotype frequency in patients with bipolar disorder compared to controls ( $\chi^2$ : 4.352,  $p = 0.113$ ), and a tendency for an increase of 1513AA and 1513AC frequency in patients compared to controls ( $p = 0.055$ ), which can be clearly observed in the representative **Figure 1**.

Demographic and clinical characteristics of 18 patients with bipolar disorder and 22 healthy controls recruited for the second set of experiments are summarized in **Table 2**. Results of the P2X7R evaluation in those BD patients and controls are shown in **Fig. 2**. There are no difference between patients and controls in regards to *P2RX7* mRNA expression ( $t = -0.434$ ,  $df = 38$ ,  $p = 0.667$ ) (**Figure 2a**). In the same way, no difference was found in the P2X7R protein content ( $df = 2.667$ ,  $p = 0.51$ ) (**Figure 2b**) or in the serum levels of ATP, the P2X7R-ligant ( $df = 0.685$ ,  $p = 0.735$ ) in patients when compared to controls (**Figure 2c**).

No associations were found between clinical data and genetic data (data not shown).

## Discussion

In the present study we analyzed the 1513A>C *P2RX7* polymorphism frequency in patients with bipolar disorder in comparison to healthy controls. We demonstrated a decrease in 1513C allele frequency and a potential increase in 1513AA and 1513AA/AC genotype frequency in patients with bipolar disorder compared to controls.

The comprehension of the mutations on *P2RX7* may suggest novel insights into disease mechanisms, once SNP's influence the receptor activity by altering receptor expression and/or functional properties (Jiang et al., 2013). The 1513A>C polymorphism has been widely explored, one study have demonstrated that this mutation does not alter P2X7R channel function (Boldt et al., 2003). Nevertheless, the majority of studies supports that this mutation generates impairment in both the ion channel and dye uptake pore functions, which culminates in a significant receptor loss-of-function (Roger et al., 2010, Cabrini et al., 2005, Gu et al., 2001). It is well accepted the relationship between this loss-of-function 1513A>C SNP with different diseases such as osteoporosis, tuberculosis and cardiovascular risks and overall to inflammation sensitivity (Caseley et al., 2014).

Indeed, the P2X7R is well known for its pro-inflammatory activity (Bours et al., 2011) mediated by the activation of inflammasome and subsequent release of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) that ultimately lead to the excitotoxicity of glial and neural cells (Matute and Cavaliere, 2011, Adinolfi et al., 2017), being considered a damage-associated molecular patterns (DAMP) (Di Virgilio et al., 2009). In this sense, it is considered that carrier the 1513A>C loss-of-function polymorphism is protective against the cytotoxic effects of ATP, the P2X7R-ligant (Wesselius et al., 2012). In other words, the presence of the 1513C allele causes a severe decrease in P2X7R-associated

responses. Once our data showed in patients with bipolar disorder a decrease in 1513C allele and even a potential increase of the 1513AA and the 1513AA/AC genotype, which confers a perfectly function of the receptor, we can infer a higher functionality of P2X7R in patients with bipolar disorder compared to controls and extrapolating an increased inflammatory responsiveness. In fact, patients with bipolar disorder have a well established pro-inflammatory component, demonstrated in clinical, preclinical and postmortem studies (Berk et al., 2011, Goldstein et al., 2009, Kapczinski et al., 2011, Rao et al., 2010). In this sense, our data supports earlier findings that the *P2RX7* gene may play an important role in the genetic etiology of BD and suggest the inflammation as the study target for mediating.

In order to verify if exist a differential modulation of P2X7R associated to diagnosis, we recruited a second group of individuals and we ended up finding no difference between euthymic patients and matched healthy controls in regards to *P2RX7* gene and protein expression or ATP levels. Previous preclinical studies have been demonstrating the P2X7R as an important modulating target, mainly in animal models of mania and depression (Bhattacharya et al., 2013, Gubert et al., 2016a). A number of molecules and biomarkers are in fact dependent of bipolar stage, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and pro-inflammatory cytokines which are imbalanced in manic and depressive when compared to euthymic and control subjects (Fernandes et al., 2011, Brietzke et al., 2009). Thus, although we have not found difference on P2X7R modulation in euthymic state, we do not rule out the possibility of P2X7R modulation in acute states of BD. Indeed, it was previous demonstrated an association between cognitive manic symptoms and the *P2RX7* gene (Backlund et al., 2011).

Our results should be interpreted in light of their limitations. Our sample size was small, mainly to a genetic study, and this may have limited our power to detect a significant result in genotype analysis. Moreover, the patients enrolled for the study were all on medication and that might have had an impact on the parameters analyzed. Therefore, additional studies analyzing the P2X7R as a target with patients in acute mania and depression should be performed to clarify our hypothesis. Anyway, considering as previous demonstrated that patients with BD have a decrease in 1513C allele frequency, configuration that confers perfect function of P2X7R and the gene and protein expression seems to be the same in patients compared to controls, further corroborates a state of disadvantage of pro-inflammatory receptor activity in patients with BD compared to healthy controls.

In conclusion, this study demonstrated a differential 1513A>C *P2RX7* polymorphism presentation in BD patients in comparison to healthy controls. Our data shows a significant decrease in 1513C allele frequency and a potential increase in 1513AA and in 1513AA/AC genotype frequency in BD patients compared to controls, which indicates an enhanced function of the pro-inflammatory P2X7 receptor in BD patients. Above all, our results points out the P2X7R as a possible important mediator to the pathophysiology of BD, as well as a potential biomarker for prediction and diagnosis of the disorder. Further molecular studies are necessary to clarify the potential involvement of P2X7R and of 1513A>C *P2RX7* polymorphism in the etiology of BD.

### **Acknowledgments**

CG and RA are recipients of scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CEJM and FD are recipients of scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

We thank all subjects included in the study.

### **Conflict of Interest**

MKS has received research grants and/or speaking fees from CNPq-INCT-TM, CNPq-Universal, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Stanley Medical Research Institute (SMRI), the National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression (NARSAD), Eli Lilly, and FIPE-HCPA. FK has received grants/research support from AstraZeneca, Eli Lilly, JanssenCilag, Servier, CNPq, CAPES, NARSAD, and SMRI; has been a member of the speakers' boards for AstraZeneca, Eli Lilly, Janssen, and Servier; and has served as a consultant for Servier. AMOB and PVSM has received grant/research from CNPq.

The other authors report no conflicts of interest.

### **Contributors**

CG, RA, AMOB and PVSM designed the study; MPV, BTMQS, and AF screened the study participants; CG, RA, FD and CEJM performed the experimental analyses; CG and PVSM undertook the statistical analysis; CG, RA, AMOB, MK, FK and PVSM interpreted the results; CG, AMOB and PVSM supervised the data analysis and writing of the paper, which was revised and approved by all authors.

### **Role of funding sources**

This work was supported by grants from the National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM) (Project 573671/2008-7), INCT for excitotoxicity and neuroprotection (INCT-EN) (Project 465671/2014-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Project No 303264/2013-6), and Fundo de Incentivo à Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA). The funding agencies did not have any role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or manuscript preparation.

## References

- Adinolfi, E., Lisa Giuliani, A., De Marchi, E., Pegoraro, A., Orioli, E. and Di Virgilio, F. (2017) 'The P2X7 receptor: a main player in inflammation', *Biochem Pharmacol*.
- Backlund, L., Nikamo, P., Hukic, D. S., Ek, I. R., Träskman-Bendz, L., Landén, M., Edman, G., Schalling, M., Frisé, L. and Osby, U. (2011) 'Cognitive manic symptoms associated with the P2RX7 gene in bipolar disorder', *Bipolar Disord*, 13(5-6), pp. 500-8.
- Barden, N., Harvey, M., Gagné, B., Shink, E., Tremblay, M., Raymond, C., Labbé, M., Villeneuve, A., Rochette, D., Bordeleau, L., Stadler, H., Holsboer, F. and Müller-Myhsok, B. (2006) 'Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B(4), pp. 374-82.
- Barnett, J. H. and Smoller, J. W. (2009) 'The genetics of bipolar disorder', *Neuroscience*, 164(1), pp. 331-43.
- Berk, M., Kapczinski, F., Andreazza, A. C., Dean, O. M., Giorlando, F., Maes, M., Yücel, M., Gama, C. S., Dodd, S., Dean, B., Magalhães, P. V., Amminger, P., McGorry, P. and Malhi, G. S. (2011) 'Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors', *Neurosci Biobehav Rev*, 35(3), pp. 804-17.
- Bhattacharya, A., Wang, Q., Ao, H., Shoblock, J. R., Lord, B., Aluisio, L., Fraser, I., Nepomuceno, D., Neff, R. A., Welty, N., Lovenberg, T. W., Bonaventure, P., Wickenden, A. D. and Letavic, M. A. (2013) 'Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567', *Br J Pharmacol*, 170(3), pp. 624-40.
- Bobo, W. V. (2017) 'The Diagnosis and Management of Bipolar I and II Disorders: Clinical Practice Update', *Mayo Clin Proc*.
- Boldt, W., Klapperstück, M., Büttner, C., Sadtler, S., Schmalzing, G. and Markwardt, F. (2003) 'Glu496Ala polymorphism of human P2X7 receptor does not affect its electrophysiological phenotype', *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(3), pp. C749-56.
- Bours, M. J., Dagnelie, P. C., Giuliani, A. L., Wesselius, A. and Di Virgilio, F. (2011) 'P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation', *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, pp. 1443-56.
- Brietzke, E., Stertz, L., Fernandes, B. S., Kauer-Sant'anna, M., Mascarenhas, M., Escosteguy Vargas, A., Chies, J. A. and Kapczinski, F. (2009) 'Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder', *J Affect Disord*, 116(3), pp. 214-7.
- Cabrini, G., Falzoni, S., Forchap, S. L., Pellegatti, P., Balboni, A., Agostini, P., Cuneo, A., Castoldi, G., Baricordi, O. R. and Di Virgilio, F. (2005) 'A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes', *J Immunol*, 175(1), pp. 82-9.

- Caseley, E. A., Muench, S. P., Roger, S., Mao, H. J., Baldwin, S. A. and Jiang, L. H. (2014) 'Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers', *Int J Mol Sci*, 15(8), pp. 13344-71.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. and Stojilkovic, S. S. (2011) 'Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels', *Pharmacol Rev*, 63(3), pp. 641-83.
- Crump, C., Sundquist, K., Winkleby, M. A. and Sundquist, J. (2013) 'Comorbidities and mortality in bipolar disorder: a Swedish national cohort study', *JAMA Psychiatry*, 70(9), pp. 931-9.
- Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P. and Abbracchio, M. P. (2009) 'Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system', *Trends Neurosci*, 32(2), pp. 79-87.
- Diaz-Hernandez, J. I., Gomez-Villafuertes, R., León-Otegui, M., Hontecillas-Prieto, L., Del Puerto, A., Trejo, J. L., Lucas, J. J., Garrido, J. J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T. and Diaz-Hernandez, M. (2012) 'In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 $\beta$  and secretases', *Neurobiol Aging*, 33(8), pp. 1816-28.
- Fernandes, B. S., Gama, C. S., Ceresér, K. M., Yatham, L. N., Fries, G. R., Colpo, G., de Lucena, D., Kunz, M., Gomes, F. A. and Kapczinski, F. (2011) 'Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis.', *J Psychiatr Res*, 45(8), pp. 995-1004.
- Goes, F. S. (2016) 'Genetics of Bipolar Disorder: Recent Update and Future Directions', *Psychiatr Clin North Am*, 39(1), pp. 139-55.
- Goldstein, B. I., Kemp, D. E., Soczynska, J. K. and 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), pp. 1078-90.
- Grande, I., Berk, M., Birmaher, B. and Vieta, E. (2016) 'Bipolar disorder', *Lancet*, 387(10027), pp. 1561-72.
- Gu, B. J., Zhang, W., Worthington, R. A., Sluyter, R., Dao-Ung, P., Petrou, S., Barden, J. A. and Wiley, J. S. (2001) 'A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor', *J Biol Chem*, 276(14), pp. 11135-42.
- Gubert, C., Fries, G. R., Pfaffenseller, B., Ferrari, P., Coutinho-Silva, R., Morrone, F. B., Kapczinski, F. and Battastini, A. M. (2016a) 'Role of P2X7 Receptor in an Animal Model of Mania Induced by D-Amphetamine', *Mol Neurobiol*, 53(1), pp. 611-20.
- Gubert, C., Jacintho Moritz, C. E., Vasconcelos-Moreno, M. P., Quadros Dos Santos, B. T., Sartori, J., Fijtman, A., Kauer-Sant'Anna, M., Kapczinski, F., Battastini, A. M. and Magalhães, P. V. (2016b) 'Peripheral adenosine levels in euthymic patients with bipolar disorder', *Psychiatry Res*, 246, pp. 421-426.
- HAMILTON, M. (1960) 'A rating scale for depression.', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 23, pp. 56-62.
- Iwata, M., Ota, K. T. and Duman, R. S. (2013) 'The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses', *Brain Behav Immun*, 31, pp. 105-14.
- Jiang, L. H., Baldwin, J. M., Roger, S. and Baldwin, S. A. (2013) 'Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and

- Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms', *Front Pharmacol*, 4, pp. 55.
- Kapczinski, F., Dal-Pizzol, F., Teixeira, A. L., Magalhaes, P. V., Kauer-Sant'Anna, M., Klamt, F., Moreira, J. C., de Bittencourt Pasquali, M. A., Fries, G. R., Quevedo, J., Gama, C. S. and Post, R. (2011) 'Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder', *J Psychiatr Res*, 45(2), pp. 156-61.
- Lichtenstein, P., Yip, B. H., Björk, C., Pawitan, Y., Cannon, T. D., Sullivan, P. F. and Hultman, C. M. (2009) 'Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study', *Lancet*, 373(9659), pp. 234-9.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K. (1995) 'Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization', *PCR Methods Appl*, 4(6), pp. 357-62.
- Matute, C. and Cavaliere, F. (2011) 'Neuroglial interactions mediated by purinergic signalling in the pathophysiology of CNS disorders', *Semin Cell Dev Biol*, 22(2), pp. 252-9.
- North, R. A. and Jarvis, M. F. (2013) 'P2X receptors as drug targets', *Mol Pharmacol*, 83(4), pp. 759-69.
- Psychiatric, A. and Association (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th edn.
- Rao, J. S., Harry, G. J., Rapoport, S. I. and Kim, H. W. (2010) 'Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients', *Mol Psychiatry*, 15(4), pp. 384-92.
- Roger, S., Mei, Z. Z., Baldwin, J. M., Dong, L., Bradley, H., Baldwin, S. A., Surprenant, A. and Jiang, L. H. (2010) 'Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions', *J Psychiatr Res*, 44(6), pp. 347-55.
- Sanz, J. M., Falzoni, S., Rizzo, R., Cipollone, F., Zuliani, G. and Di Virgilio, F. (2014) 'Possible protective role of the 489C>T P2X7R polymorphism in Alzheimer's disease', *Exp Gerontol*, 60, pp. 117-9.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J. and Gabel, C. A. (2001) 'Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors', *J Biol Chem*, 276(1), pp. 125-32.
- Sperlágh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K. and Illes, P. (2006) 'P2X7 receptors in the nervous system', *Prog Neurobiol*, 78(6), pp. 327-46.
- Walker, R. M., Rybka, J., Anderson, S. M., Torrance, H. S., Boxall, R., Sussmann, J. E., Porteous, D. J., McIntosh, A. M. and Evans, K. L. (2015) 'Preliminary investigation of miRNA expression in individuals at high familial risk of bipolar disorder', *J Psychiatr Res*, 62, pp. 48-55.
- Wesselius, A., Bours, M. J., Arts, I. C., Theunisz, E. H., Geusens, P. and Dagnelie, P. C. (2012) 'The P2X(7) loss-of-function Glu496Ala polymorphism affects ex vivo cytokine release and protects against the cytotoxic effects of high ATP-levels', *BMC Immunol*, 13, pp. 64.
- Xu, Y., Wang, J., Rao, S., Ritter, M., Manor, L. C., Backer, R., Cao, H., Cheng, Z., Liu, S., Liu, Y., Tian, L., Dong, K., Yao Shugart, Y., Wang, G. and Zhang, F. (2017) 'An Integrative Computational Approach to Evaluate Genetic Markers for Bipolar Disorder', *Sci Rep*, 7(1), pp. 6745.
- Young, R. C., Biggs, J. T., Ziegler, V. E. and Meyer, D. A. (1978) 'A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity.', *Br J Psychiatry*, 133, pp. 429-35.

## Figure Legends

### **Fig 1. Representative 1513A>C genotype frequency in bipolar disorder patients compared to controls.**

1513A>C genotype frequency (%) in patients with bipolar disorder (BD) and healthy controls. The 1513A>C is associated in heterozygosis (AA) with the perfectly function of receptor, in heterozygosis (AC) with a 50% decrease in P2X7R responses, and in homozygosis (CC) to a near complete loss of P2X7R function (Gu et al., 2001).

### **Fig 2. P2X7R evaluation in patients with bipolar disorder and healthy controls.**

a) *P2RX7* mRNA levels by RT-PCR from PBMC's; Student's t-test, data expressed by mean and SD. b) Qualitative and quantitative representation of P2X7R protein content by Western blot analysis from PBMC's. Mann-Whitney test, data expressed by median and IQR. c) Blood serum ATP levels (mg/dL) by HPLC; Mann-Whitney test, data expressed by median and IQR. BD: Bipolar Disorder; PBMC's: peripheral blood mononuclear cells; RT-PCR: real-time polymerase chain reaction; HPLC: high pressure liquid chromatography; RQ: relative quantification; SD: standard deviation; IQR: interquartile range.

**Table 1.**

Characteristics of controls and patients with bipolar disorder that are genotyped and the allelic and genotypic frequencies of 1513A>C polymorphism in the respective groups

Characteristic	Control (n = 184)	BD (n = 154)	<i>p</i>
Age (years) <sup>a,b</sup>	39.87 (13.98)	43.14 (10.49)	>0.05
Sex (male/female) <sup>c,d</sup>	45.5/52.7	19.6/78.4	<0.05
HDRS <sup>a</sup>		19.67 (8.98)	
YMRS <sup>a</sup>		1.21 (2.13)	
MADRS <sup>a</sup>		26.8 (7.63)	
FAST <sup>a</sup>		41.09 (14.68)	
Medications <sup>c</sup>			
Lithium		46.1%	
Valproate		33.8%	
Antidepressants		16.2%	
Anticonvulsants		18.2%	
Atypical antipsychotics		24%	
Typical antipsychotics		17.5%	
Benzodiazepines		36.4%	
Alleles % (n)			
A	76.4 (281)	82.8 (255)	
C	23.6 (87)	17.2 (53)	0.045*
Genotype % (n)			
AA	57.6 (106)	68.2 (105)	0.113 <sup>#</sup>
AC	37.5 (69)	29.2 (45)	
CC	4.9 (9)	2.6 (4)	

<sup>a</sup>Mean (standard deviation); <sup>b</sup>Student's t-test; <sup>c</sup>Valid percentage; <sup>d</sup>Chi-square test. \*Fisher exact test. <sup>#</sup>Chi-square test. HDRS (Hamilton Depression Ratio Scale); YMRS (Young Mania Ratio Scale); MADRS (Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale); FAST (Functioning Assessment Short Test).

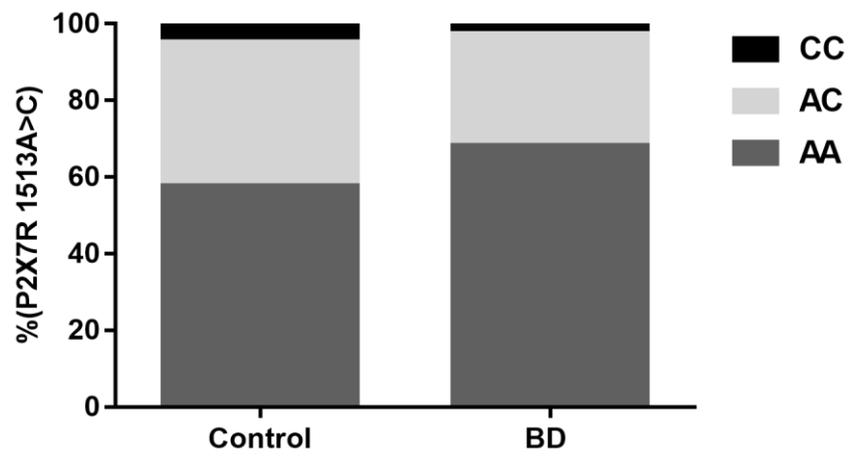
**Table 2.**

Characteristics of controls and patients with bipolar disorder

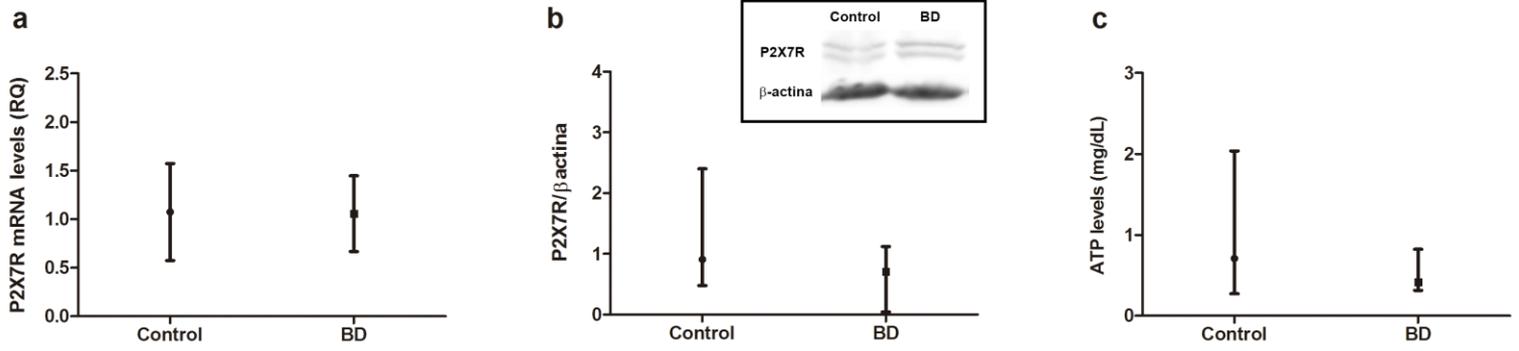
Characteristic	Control (n = 18)	BD (n = 22)	<i>p</i>
Age (years) <sup>a,b</sup>	48.17 (13.2)	47.24 (7.2)	>0.05
Sex (male/female) <sup>c,d</sup>	33.3/66.7	35.4/64.5	>0.05
HDRS <sup>a</sup>		4.14 (2.1)	
YMRS <sup>a</sup>		0.8 (1.2)	
FAST <sup>a</sup>		23.7 (10.2)	
Medications <sup>c</sup>			
Lithium		25%	
Valproate		4.2%	
Antidepressants		4.2%	
Atypical antipsychotics		8.3%	
Typical antipsychotics		12.5%	
Benzodiazepines		16.7%	

<sup>a</sup>Mean (standard deviation); <sup>b</sup>Student's t-test; <sup>c</sup>Valid percentage; <sup>d</sup>Chi-square test. HDRS (Hamilton Depression Ratio Scale); YMRS (Young Mania Ratio Scale); FAST (Functioning Assessment Short Test).

**Figure 1.**



**Figure 2.**



### **Capítulo 3**

#### **P2X7 receptor as a new therapeutic target in acute mania: a preclinical study**

Carolina Gubert, Roberta Andrejew, Carlos Eduardo Leite, Cesar Eduardo Jacintho Moritz, Flávio Kapczinski, Pedro Vieira da Silva Magalhães, Ana Maria Oliveira Battastini

Periódico: **Bipolar Disorders**

Status: **manuscrito a ser submetido à publicação**

## **P2X7R participates in the pathophysiology of mania: a preclinical study**

Carolina Gubert<sup>a</sup>, Roberta Andrejew<sup>a</sup>, Carlos Eduardo Leite<sup>b</sup>, Cesar Eduardo Jacintho Moritz<sup>c</sup>, Flávio Kapczinski<sup>d</sup>, Pedro Vieira da Silva Magalhães<sup>e,f</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, MacMaster University, Hamilton, Canada

<sup>e</sup> Bipolar Disorder Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal Rio Grande do Sul, 90035-903 RS, Brazil

### **Corresponding author:**

\*Ana Maria Oliveira Battastini,

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel: +55 (51) 3308.5554, Fax: +55 (51) 3308.5535, E-mail: [abattastini@gmail.com](mailto:abattastini@gmail.com)

## **Abstract**

The pathophysiology of bipolar disorder remains incompletely elucidated. The purinergic receptor P2X7 (P2X7R) has a central function in neuroinflammation, establishment and maintenance of microglial activation and neuronal damage/death, all characteristics already described for bipolar disorder pathology. The present work aims to explore the participation of P2X7R in a preclinical pharmacological model of mania. We analyzed the modulatory effects of P2X7R antagonist brilliant blue (BBG) (45mg/kg) on assessments related to behavior, monoamines, gene expression and serum purine levels in a pharmacological model of mania induced by D-amphetamine (AMPH) (2mg/kg) in mice. Overall, our results corroborate the association between the P2X7 receptor and the preclinical animal model of mania, demonstrated by the decreased responsiveness to AMPH in animals with pharmacologically blocked P2X7R. This study further suggests a possible dopaminergic mechanism for the action of P2X7 receptor modulation that could explain the observed behavioral outcome. Additionally, we observed a possible compensatory attempt to reverse the damage caused by the mania model induced by AMPH with the increasing of adenosine levels peripherally, a neuroprotective molecule, and the expression of NTPD3 centrally, which guaranteed the hydrolysis of ATP, a danger signal. In conclusion, our results support the hypothesis that P2X7R plays an important role in the pathophysiology of mania, mainly mediating the dopaminergic via that is reflected in the observed behavioral change. Above all, this study suggests a purinergic system imbalance associated with preclinical animal model of mania induced by AMPH and points out the P2X7R as a promising new molecular target for bipolar disorder.

**Key words:** bipolar disorder, amphetamine, purinergic signaling, P2X7R, dopaminergic axis, adenosine, NTPD3

## **Introduction**

Emil Kraepelin, the important psychiatrist of the mid-nineteenth century not only contributed to the nosology of bipolar disorder (1), as also suggested an association between manic symptoms and the Purinergic System to the pathology of the disorder (2). Purinergic signaling includes nucleotides and nucleosides, a large family of ectonucleotidases and purinoreceptors (3), and is implicated in physiological and pathological conditions, with functions relevant to secretion, immune responses, cell death and inflammation (4). Indeed, recently, purinergic pathophysiology mainly in form of ATP and adenosine signaling have been related to numerous medical conditions, especially neurodegenerative and psychiatric disorders, including bipolar disorder (5, 6). Since the pathophysiology of bipolar disorder remains incompletely elucidated (7), the purinergic system has the possibility of shedding some light on the mechanisms and biological underpinnings of this illness.

Notably, the purinergic receptor P2X7 (P2X7R) has a potential role in the pathophysiology of bipolar disorder (8). P2X7R is an adenosine 5'-triphosphate (ATP)-binding ligand-gated ion channel activated by high concentrations of extracellular ATP (9). This receptor has a central function in neuroinflammation, establishment and maintenance of microglial activation and neuronal damage/death (10). These characteristics have been previously discussed as disease processes in bipolar disorder (11-13). Additionally, it has been shown that the gene coding for P2X7R is located on a susceptibility locus associated with bipolar disorder, with specific polymorphisms associated with the disorder (14) (15). Indeed this relation was verified in animal models of mania and it has been demonstrated that blockade/deletion of P2X7R decreases AMPH-induced hyperactivity (16, 17) and prevent proinflammatory states (18).

Although those studies have demonstrated the interaction between P2X7R and the bipolar disorder, it is still unclear how – via which mechanisms – this occurs. The present work aims to explore the modulatory effects of P2X7R on assessments related to behavior, monoamines, gene expression and serum purine levels in a preclinical pharmacological model of mania induced by treatment with D-amphetamine (AMPH).

## **Methods**

### **Animals**

The Animal Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil approved this project under protocol number 15-0192. Sixty-four male C57BL/6 mice (age 6–8 weeks; weight 18–25 g) were used in all experiments conducted. The experimental procedures reported in this manuscript were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [18] and the Brazilian College of Animal Experimentation. The animal handling pattern and experiment details follow previous work (18).

### **Drugs and Treatment**

D-amphetamine sulfate salt (AMPH) and all other drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless indicated otherwise. The pharmacological animal model of mania induced by AMPH was adapted from previous studies (18-20) and performed as follows: mice received intraperitoneal (i.p.) injections of AMPH (2 mg/kg) or vehicle (saline, 0.9 % NaCl) once a day for seven consecutive days. Mice also received intraperitoneal (i.p.) injections of non-selective P2X7R antagonist Brilliant blue G (BBG) (45mg/kg) or vehicle (saline, 0.9 % NaCl) 30 min prior the AMPH injection. No behavioral test was performed between days 1 and 6. On the seventh day of treatment, immediately after the last AMPH or saline injection, mice were subjected to the open field apparatus for one hour. After the behavioral test, the animals were euthanized by anesthetic overdose of the 12% isoflurane inhalation agent until promotion of cardiorespiratory arrest, according to the guidelines of the CONCEA euthanasia practice, 2013. The hippocampal and striatal brain structures were dissected for further analysis.

### **Open Field Test**

Locomotor activity was assessed using the open field test as previously described (18). The animal's behavior was recorded and analyzed using the ANY-Maze

video-tracking system (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). The apparatus was cleaned with ethanol 70 % after each trial.

### **Monoamines and glutamate determination**

The hippocampal and striatum structures were bilaterally dissected on ice and stored at -80 ° C overnight. The monoamines determination were performed by using Ultra-high Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (UHPLC-MS) in accordance with previous studies (21, 22). The results were expressed as ng/mg tissue for dopamine, DOPAC and 5-HT and µg/mg tissue for glutamate.

### ***mRNA analysis***

Total RNA from hippocampus was isolated with TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized with Reverse Transcription System (Promega) from 2 µg of total in accordance with the manufacturer's instructions. Real time PCR analysis was performed in the StepOne™ Real-Time PCR Systems Instrument (Applied Biosystems®, Foster City, CA) using the SYBR® Green amplification System, according manufacturer's instructions and respective forward and reverse primers (10 µM) (**Table 1**). All results were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (23), using for determination of relative expression data, taking β-actin gene expression as an endogenous control for normalization.

### **Serum Purine levels analysis**

Purine levels were determined in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC). Three milliliters of mice blood were collected by trans-cardiac blood collection into an anticoagulant-free vacuum tube for each mouse 30min after the last injection. Immediately after collection, blood samples were centrifuged at 1,000 x g for 10min and the serum was aliquoted, labeled and stored at -80 °C until assay testing. The protocol was performed according to a method previously described (24) with minor modifications. The amounts of purines were measured by absorption at 260 nm. Purine

concentrations (ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, xanthine, hypoxanthine and uric acid) are expressed as  $\mu\text{M}$ .

## Statistical Analysis

Results were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA). The model includes two fixed factors: the AMPH administration as the animal model of mania and the administration of the P2X7R antagonist, BBG. Tukey's multiple comparison *post hoc* test or Sidak *post hoc* test were performed to identify differences. Correlations between continuous variables were assessed using Pearson correlation test. Significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses and graphics were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0 for Windows and the GraphPad Prism software version 7.0 for Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA), respectively. All data are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) or standard error (SD) when appropriate.

## Results

### P2X7R and hyperlocomotion induced by AMPH

The **Figure 1** represents the behavior after pharmacological modulation of P2X7R in a preclinical animal model of mania. In the locomotor activity parameter, two-way ANOVA revealed a significant interaction between the effects of P2X7R modulation and the AMPH-induced mania model ( $F=8.803$ ;  $df=1$ ;  $p=0.006$ ) (**Figure 1a**). We also found main effects for P2X7R modulation ( $F=10.09$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0035$ ) and AMPH treatment ( $F=103.5$ ,  $df=1$ ;  $p < 0.0001$ ). *Post hoc* analysis indicated that AMPH increased locomotor activity compared to control and to the BBG group, setting up the mania model in the mice. Although the co-treatment with BBG and AMPH demonstrated an increase in the locomotion in comparison with control and BBG group, the treatment with AMPH resulted in a significantly decreased hyperlocomotion in the group of animals co-treated with the P2X7R antagonist, BBG, indicating that the non-selective P2X7R pharmacological blockade reduces the behavioral action of AMPH. Similarly, in the mean speed parameter, two-way ANOVA revealed a significant effect of the P2X7R modulation ( $F=11.23$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0022$ ) and the AMPH treatment ( $F=77.61$ ,  $df=1$ ;

$p < 0.0001$ ) (**Figure 1c**). Indeed, *post hoc* analysis showed that the treatment with AMPH causes a significant increase in the mean speed of the animals when compared to the control group and the BBG group. Co-treatment of BBG and AMPH also showed a significant increase in mean speed compared to control and BBG groups. On the other hand, AMPH treatment resulted in a significantly decreased mean speed in the group of animals co-treated with the P2X7R antagonist, BBG compared to the AMPH group. In contrast, the total immobility time was significantly lower in the group of AMPH-treated animals than in the control group and compared to the BBG group (**Figure 1e**). Co-treatment of AMPH and BBG also showed a decrease in the immobility time in the animals compared to the control group and BBG, and even though it was a shorter immobility time than the control group, there was no statistical difference in this case. These behavioral analyzes indicate that the action of the P2X7R modulation is more involved in the movement of the animal itself, apparently antagonizing P2X7R results in a decrease in the mean speed of the animal induced by AMPH, which will reflect more directly on the observed distance traveled.

Observing the locomotion, the mean speed and the immobility time of the animals (**Figure 1b, 1d and 1f**) we can say that the analysis of 60 min seems to be the most adequate once if we had chosen the beginning times points like 5 or 10 min, as commonly used (25, 26), we would lose an important result. Due to this analysis we can also observe a course of inverted U-shaped for AMPH group. The peak of this pattern occurs in 30 min. In this case, the 60 min analysis allows us to verify the full extent of the AMPH action and to better visualize its modulation, since co-treatment with BBG appears to visually prevent this pattern. This compilation of behavioral results helps us to draw a behavioral pattern from the mania model induced by AMPH administration in mice and to understand the involvement of P2X7R in these outcomes.

A sub-analysis focused on the distance traveled in the first 5 min of behavior, which evaluate the exploration of the animal to the new environment where it was placed (27), did not show any statistical difference between the groups (**Figure 1g**). It has been previously demonstrated in comparative studies between humans and mice that AMPH has an action to increase the locomotion of the individuals, but not to increase their exploration (28), corroborating the results of this work. However, another sub-analysis that evaluated the vertical behavior of the animals in the same first 5 minutes of

behavior, determined by the number of rearing, showed according to previous studies (29), increase in this behavior in the group of animals treated with AMPH in comparison to the control animals and treated with BBG (**Figure 1h**). On the other hand, the co-treatment of AMPH and BBG prevented the increase of rearing performed by treatment with AMPH alone. This result corroborates the action of AMPH on the vertical activity of animals and suggests an action of P2X7R in this behavior, since when antagonized the behavior is no longer observed.

### **P2X7R is involved in the hyperlocomotion induced by AMPH via dopaminergic modulation**

**Figure 2** displays the P2X7R modulatory effects on monoamines in the model of mania induced by AMPH treatment. Regarding to dopamine levels in striatum, although an effect of the AMPH treatment ( $F=4.77$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0369$ ) was observed, *post hoc* analysis did not show any difference (**Figure 2a**). Two-way ANOVA revealed a significant effect of the P2X7R modulation ( $F=9.802$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0042$ ) and the AMPH treatment ( $F=7.44$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0111$ ) (**Figure 2b**). *Post hoc* analysis revealed significantly increased in the hippocampus DOPAC levels via treatment with AMPH compared to the control group as well as in comparison to the BBG group. Co-treatment with AMPH and BBG was able to prevent increased levels of DOPAC compared to the AMPH group. We observed that the modulation of P2X7 by BBG caused an effect on DOPAC levels ( $F=10.14$ ,  $df=1$ ;  $p=0.004$ ) and the AMPH treatment ( $F=15.09$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0007$ ) (**Figure 2c**). *Post hoc* analysis demonstrated an opposite pattern than the hippocampus, with a decrease in the striatum DOPAC levels via treatment with AMPH compared to the control group and in comparison to the BBG group.

With respect to serotonin levels in the hippocampus, two-way ANOVA revealed a significant effect of the P2X7R modulation ( $F=4.561$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0416$ ) and the AMPH treatment ( $F=42.31$ ,  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) (**Figure 2 d**). *Post hoc* analysis indicates a significantly decreased in the AMPH-treated group compared to the control and BBG groups, as well as in the group co-treated with AMPH and BBG compared to the control groups and BBG. Still, serotonin levels in the striatum presented a significant effect of the AMPH treatment ( $F=25.99$ ,  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) (**Figure 2 e**). *Post hoc* analysis pointed

significant decrease in the AMPH treated group compared to the control and BBG groups, as well as in the group co-treated with AMPH and BBG and BBG.

In a similar way, AMPH treatment had significant effect in the glutamate levels in the hippocampus ( $F=381.1$ ,  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) (**Figure 2f**). A decrease in hippocampal glutamate levels was demonstrated in the AMPH-treated group compared to both the control group and the BBG group. Also in the group co-treated with AMPH and BBG, hippocampal glutamate levels were decreased compared to the control and BBG groups. The treatment with AMPH had a significant effect in glutamate levels in the striatum ( $F=239.1$ ,  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) (**Figure 2g**). The *post hoc* analysis showed a decrease in the striatum glutamate levels in AMPH group compared to both the control group and the BBG group and in the group co-treated with AMPH and BBG decreased striatum glutamate levels compared to the control and BBG groups. The dopamine levels in the hippocampus were below the detectable levels and it was not possible to be analyzed and represented (data not shown).

### **The hippocampal DOPAC levels and total distance traveled (m) are positively correlated**

Pearson correlation test demonstrated a significant positive correlation between hippocampal DOPAC levels and total distance traveled (m) in mice (**Fig. 3**), confirming the dopaminergic involvement in the hyperlocomotion.

### **The hippocampal ENTPD3 gene expression is increased by AMPH and the blockade of P2X7R is able to prevent it.**

**Figure 4** shows the analysis of gene expression in total RNA isolated from mice hippocampus. In regards to relative expression of P2RX7 (**Figure 4a**), tyrosine hydroxylase (TH) (**Figure 4b**), dopamine transporter (DAT) (**Figure 4c**), ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ENTPD1) (**Figure 4d**) and ecto-5'-nucleotidase (NT5E) (**Figure 4f**) we had not observe any statistical difference between groups. However, in the the relative expression of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (ENTPD3) (**Figure 4e**) we had an effect of the AMPH treatment

( $F=8.37$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0135$ ) and *post hoc* analysis indicated an increase of relative expression with the AMPH treatment in comparison to control, which was prevented with the P2X7R pharmacological blockade.

### **Serum purine levels and P2X7R modulation**

**Figure 5** displays the serum purine levels in the animal model of mania and after P2X7R modulation. We did not observe any significant difference in serum ATP levels (**Figure 5a**). In regards to serum ADP levels, two-way ANOVA revealed a significant interaction between the effects of P2X7R modulation and the AMPH-induced mania model ( $F=25.22$ ;  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) (**Figure 5b**). We also found an effect of the P2X7R modulation ( $F=33.07$ ,  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) and the AMPH treatment ( $F=38.92$ ,  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) in ADP levels. *Post hoc* analysis indicated that the co-treatment with AMPH and BBG was able to increase serum ADP levels in comparison to the control group. In serum AMP levels, we found an effect of AMPH treatment ( $F=8.806$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0076$ ) and a decrease of serum AMP levels in the group co-treated with BBG and AMPH compared to controls (**Figure 5c**).

Two-way ANOVA revealed an effect of the P2X7R modulation ( $F=6.339$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0204$ ) and the AMPH treatment ( $F=16.53$ ,  $df=1$ ;  $p=0.0006$ ) for serum adenosine levels (**Figure 5d**). *Post hoc* analyses showed that AMPH and the co-treatment of BBG and AMPH were able to increase serum adenosine levels, both in comparison to controls. No significant differences were found in serum inosine (**Figure 5e**), xanthine (**Figure 5f**) and hypoxanthine (**Figure 5g**) levels. Lastly, with respect to serum acid uric levels, we found an effect of AMPH treatment ( $F=54.03$ ,  $df=1$ ;  $p<0.0001$ ) (**Figure 5h**). *Post hoc* analyses showed that AMPH and the co-treatment of BBG and AMPH were able to decrease serum uric acid levels, both in comparison to controls.

## Discussion

Initially, our results corroborate the previously demonstrated association between the P2X7 receptor and an animal model of mania. This is shown by the decreased responsiveness to AMPH in animals that had the P2X7R pharmacologically blocked. However, in this study we were able to go further, by suggesting possible dopaminergic mechanisms for the action of P2X7 receptor modulation that were associated with the behavioral outcomes.

We have previously demonstrated that blockade and deletion of P2X7R interferes negatively on the establishment of the animal model of mania (18). Here, we observed a decrease in hyperlocomotion in animals co-treated with BBG and AMPH compared to animals treated with AMPH, which is in agreement with previous results (16, 17). We have chosen the BBG, a non-selective antagonist of P2X7R due to its characteristic of crossing the blood-brain barrier (30), facilitating peripheral administration. The dose of 45 mg/kg, via i.p, is widely used and has already been shown to reach the brain concentration of 200 and 220 nM (31) which is within the effective range of BBG on P2X7R (32). BBG treatment resulted in a partial blockade of the receptor, observed for decreased locomotor activity compared to the AMPH group, it was not able to prevent this behavior at the control level, as observed in the previous study with the use of the selective antagonist A438079 intracerebroventricularly (18). This is probably because of BBG ability to also antagonize the P2X1, 2, 4 and 5 receptors (Revised in (10)), which disperses their action on the P2X7 receptor. Nevertheless, the use of knockout mice for P2X7R confirmed the selective participation of P2X7R in modulation of the animal model of mania (18), thus, this BBG working model is quite effective and useful for understanding the involvement of the P2X7 receptor in the AMPH-induced mania model.

A key result shown in this work is the increased levels of the dopamine metabolite, DOPAC, induced by AMPH treatment and the prevention of this increase caused by treatment with the P2X7R antagonist in hippocampus. The action of AMPH on dopaminergic levels is already well defined (33, 34), as well as the increase of this neurotransmitter in episodes of mania in patients (35), which is also rational of animal models. Considering increased levels of the dopamine metabolite DOPAC in the

hippocampus of AMPH-treated animals reflect an earlier dopamine peak that was rapidly metabolized, makes it reasonable not been quantified in hippocampus. Many studies indicate that the nucleus accumbens-hippocampus pathway acts on the release of dopamine directly on locomotor activity (39-41). In this way, we can think that the observed increase of this pathway, specifically in the hippocampus by AMPH treatment may be responsible for the increased hyperlocomotion observed, which was indeed confirmed by the observed positive correlation between hippocampal DOPAC levels and total distance traveled. P2X7 receptor modulation, in its turn, prevents the increasing of DOPAC levels and hyperlocomotion, both of which were induced by AMPH, indicating a possible dopaminergic mechanism for the action of P2X7 receptor that is reflected in the animal behavior.

On the other hand, the same profile was not found in the striatum, which is in agreement with a study that reported an increase in locomotion in euthymic patients after administration of AMPH, and did not show an increase in dopamine levels in the striatum (33). We also evaluated serotonin and glutamate levels, other important neurotransmitters for bipolar disorder (42). We observed that the pharmacological mania model decreases the levels of both serotonin and glutamate in both hippocampal and striatum structures and that differently from modulation of dopaminergic signaling, treatment with BBG does not cause any difference in this effect. There is evidence that in patients with bipolar disorder there is a decrease in glutamate levels (43), as well as neuroimaging studies have demonstrated a decrease in neuronal integrity in bipolar disorder patients (44). Still, a very interesting study with chronic use of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine), a drug with action similar to AMPH, demonstrated a peak of dopamine and serotonin in rodents, followed by selective depletion of serotonergic neurons (45), which could explain the decrease in the levels of serotonin observed by the treatment with AMPH in this work. However, the results of the present work indicate that the action of the P2X7R antagonist in this animal model involved the dopaminergic and non-serotonergic or still glutamatergic system.

To further investigate the purinergic and dopaminergic relationship in the hippocampus of animals we evaluated the gene expression of key participants of both systems. Interestingly we found an increase of NTPD3 relative expression with the AMPH treatment in comparison to control, which was prevented by the P2X7R

pharmacological blockade. The enzyme NTPD3 is an ectonucleotidase expressed in multiple regions of the brain (46), primarily in neuronal cells (47) and has the ability to hydrolyze ATP very efficiently (48). This action has fundamental importance in the complex microenvironment presented by the nervous system, since it is not interesting for the neurons that the ATP is accumulated in the extracellular environment, as in high concentrations it can establish neuroinflammation (49) and ultimately induce neuronal death (50). This could be viewed as a compensatory attempt to reverse the damage caused by the mania model induced by AMPH, once increase the expression of NTPD3, which guaranteed the hydrolysis of ATP. It is possible that the co-treatment with BBG prevented the NTPD3 increase because all the inflammatory and excitotoxicity pattern established by AMPH is also diminished (18). Although we observed dopaminergic modulation with the treatments performed in the animals, apparently it is not via gene expression of the enzyme tyrosine hydroxylase nor the dopamine transporter in this case, further studies are needed to define the set point.

In order to understand the pattern of response to the mania model, focusing on the action of ectonucleotidases, we have collected blood from the animals to evaluate the general purinergic profile at the point of 30 min after treatment. Interestingly we found an effect of the P2X7R modulation and the AMPH treatment in serum adenosine levels, which indicates a movement of increasing levels of a molecule known to be neuroprotective and anti-inflammatory (51). Adenosine is also involved in the regulation of important CNS mechanisms, such as modulate glutamatergic and dopaminergic neurotransmission (52). In this sense, this response at the peak of hyperlocomotion indicates perhaps an overall compensatory attempt to reverse the damage caused by the mania model, which along with other data reflect the observed behavioral outcome. Even though previous studies have demonstrated adenosine modulators, which induce increased levels of adenosine might have ‘antimanic’ effects (53, 54). It is possible that blocking P2X7R alone allows an accumulation of adenosine, since once this receptor is blocked, it leads to the ATP on the route of purine degradation. Apparently, this result is also a compensatory attempt to reverse the damage caused by the mania model induced by AMPH.

In contrast, we demonstrated an effect of AMPH treatment on decreasing uric acid levels. It is well accepted that subjects with bipolar disorder have uric acid levels

higher than healthy controls (55); indeed, there are evidence to the role of uric acid as state marker in bipolar disorder (56). In the first moment, our results seem to be in disagreement with the literature; however, it is possible that this difference is due to the moment of analysis, since our data represents the behavioral peak of the animal model, which is often not possible to evaluate in studies with patients. Also should be considered the fact that once there was accumulation of adenosine, seems reasonable to observe a decrease of uric acid, since it is the end product of the purines catabolism (57). Anyway, the current study supports the hypothesis of a purinergic system imbalance associated with animal model of mania.

Some limitations of this study should be considered. Although it is difficult the development of psychiatric animal models (58), the most well-established animal model of mania is the administration of AMPH for both mice and rat, based on the fact that there is an increase in dopamine levels in patients during the mania episode (35). The construct and predictive validities of the model have been proven, correlating findings in animals with clinical data and biochemistry observed in patients (58, 59). In addition, we were not able to establish the specific mechanisms mediating the P2X7R participation on dopaminergic response induced by AMPH. In this sense, our results suggest some pathways of relevance, but more studies are needed to characterize the P2X7R involvement on dopaminergic response induced by AMPH.

In conclusion, our results add some new information that support the hypothesis that P2X7R plays an important role in the pathophysiology of mania, mainly mediating the dopaminergic pathway that is reflected in the observed behavioral change. We suggest a compensatory attempt to reverse the damage induced by AMPH with the increasing of adenosine levels peripherally and the expression of NTPD3 centrally. Finally, the study suggests an imbalance in the purinergic system that can be induced by the animal model used, pointing to the P2X7R as a promising new molecular target for bipolar disorder.

### **Acknowledgments**

CG and RA are recipients of scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CEJM is recipient of scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Conflict of Interest**

FK has received grants/research support from AstraZeneca, Eli Lilly, JanssenCilag, Servier, CNPq, CAPES, NARSAD, and SMRI; has been a member of the speakers' boards for AstraZeneca, Eli Lilly, Janssen, and Servier; and has served as a consultant for Servier. AMOB and PVSM has received grant/research from CNPq.

The other authors report no conflicts of interest.

### **Contributors**

CG, RA, AMOB and PVSM designed the study; CG, RA, CEL and CEJM performed the experimental analyses; CG and PVSM undertook the statistical analysis; CG, RA, AMOB, FK and PVSM interpreted the results; CG, AMOB and PVSM supervised the data analysis and writing of the paper, which was revised and approved by all authors.

### **Role of funding sources**

This work was supported by grants from the National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM) (Project 573671/2008-7), INCT for excitotoxicity and neuroprotection (INCT-EN) (Project 465671/2014-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Project No 303264/2013-6), and Fundo de Incentivo à Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA). The funding agencies did not have any role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or manuscript preparation.

## References

1. Mondimore FM. Kraepelin and manic-depressive insanity: an historical perspective. *Int Rev Psychiatry*. 2005;17(1):49-52.
2. Kraepelin E. *Manic-Depressive Insanity and Paranoia*. Edinburgh 1921.
3. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50(3):413-92.
4. Baroja-Mazo A, Barberà-Cremades M, Pelegrín P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(1):79-93.
5. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol*. 2017;8:661.
6. Cheffer A, Castillo ARG, Corrêa-Velloso J, Gonçalves MCB, Naaldijk Y, Nascimento IC, et al. Purinergic system in psychiatric diseases. *Mol Psychiatry*. 2018;23(1):94-106.
7. Bobo WV. *The Diagnosis and Management of Bipolar I and II Disorders: Clinical Practice Update*. Mayo Clin Proc. 2017.
8. Backlund L, Nikamo P, Hukic DS, Ek IR, Träskman-Bendz L, Landén M, et al. Cognitive manic symptoms associated with the P2RX7 gene in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2011;13(5-6):500-8.
9. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 2002;82(4):1013-67.
10. Sluyter R. The P2X7 Receptor. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1051:17-53.
11. Rao JS, Harry GJ, Rapoport SI, Kim HW. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. *Mol Psychiatry*. 2010;15(4):384-92.
12. Stertz L, Magalhães PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 2013;26(1):19-26.
13. Berk M, Kapczinski F, Andreatza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):804-17.
14. Barden N, Harvey M, Gagné B, Shink E, Tremblay M, Raymond C, et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B(4):374-82.
15. McQuillin A, Bass NJ, Choudhury K, Puri V, Kosmin M, Lawrence J, et al. Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders. *Mol Psychiatry*. 2009;14(6):614-20.
16. Bhattacharya A, Wang Q, Ao H, Shoblock JR, Lord B, Aluisio L, et al. Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br J Pharmacol*. 2013;170(3):624-40.
17. Csölle C, Andó RD, Kittel Á, Gölöncsér F, Baranyi M, Soproni K, et al. The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(1):213-33.
18. Gubert C, Fries GR, Pfaffenseller B, Ferrari P, Coutinho-Silva R, Morrone FB, et al. Role of P2X7 Receptor in an Animal Model of Mania Induced by D-Amphetamine. *Mol Neurobiol*. 2016;53(1):611-20.
19. Engel T, Gomez-Villafuertes R, Tanaka K, Mesuret G, Sanz-Rodriguez A, Garcia-Huerta P, et al. Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J*. 2012;26(4):1616-28.

20. Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci.* 2006;31(5):326-32.
21. González AG, Zavala LC, Moreno AP, San Juan ER, Ferrara JG, Espinosa LR, et al. Pharmacokinetics of diphenylboroxazolidones of L- $\alpha$ -amino acids with activity on the CNS: quantification in rat DBS by UPLC-MS/MS. *Bioanalysis.* 2011;3(4):439-48.
22. Hows ME, Lacroix L, Heidbreder C, Organ AJ, Shah AJ. High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological samples. *J Neurosci Methods.* 2004;138(1-2):123-32.
23. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4(6):357-62.
24. Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J Chromatogr.* 1980;199:345-54.
25. Gould TJ, Keith RA, Bhat RV. Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine-induced open-field activity in two inbred strains of mice. *Behav Brain Res.* 2001;118(1):95-105.
26. Scotti MA, Lee G, Stevenson SA, Ostromecki AM, Wied TJ, Kula DJ, et al. Behavioral and pharmacological assessment of a potential new mouse model for mania. *Physiol Behav.* 2011;103(3-4):376-83.
27. Li CR, Huang GB, Sui ZY, Han EH, Chung YC. Effects of 6-hydroxydopamine lesioning of the medial prefrontal cortex on social interactions in adolescent and adult rats. *Brain Res.* 2010;1346:183-9.
28. Minassian A, Young JW, Cope ZA, Henry BL, Geyer MA, Perry W. Amphetamine increases activity but not exploration in humans and mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(2):225-33.
29. Macêdo DS, Medeiros CD, Cordeiro RC, Sousa FC, Santos JV, Morais TA, et al. Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by D-amphetamine. *Bipolar Disord.* 2012;14(7):707-18.
30. Kimbler DE, Shields J, Yanasak N, Vender JR, Dhandapani KM. Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice. *PLoS One.* 2012;7(7):e41229.
31. Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, León-Otegui M, Hontecillas-Prieto L, Del Puerto A, Trejo JL, et al. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 $\beta$  and secretases. *Neurobiol Aging.* 2012;33(8):1816-28.
32. Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol.* 2007;151(5):571-9.
33. Anand A, Verhoeff P, Seneca N, Zoghbi SS, Seibyl JP, Charney DS, et al. Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *Am J Psychiatry.* 2000;157(7):1108-14.
34. Daberkow DP, Brown HD, Bunner KD, Kraniotis SA, Doellman MA, Ragozzino ME, et al. Amphetamine paradoxically augments exocytotic dopamine release and phasic dopamine signals. *J Neurosci.* 2013;33(2):452-63.
35. Berk M, Dodd S, Kauer-Sant'anna M, Malhi GS, Bourin M, Kapczinski F, et al. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 2007(434):41-9.
36. Yatham LN, Liddle PF, Lam RW, Shiah IS, Lane C, Stoessl AJ, et al. PET study of the effects of valproate on dopamine D(2) receptors in neuroleptic- and mood-stabilizer-naive patients with nonpsychotic mania. *Am J Psychiatry.* 2002;159(10):1718-23.
37. Mamelak M. An amphetamine model of manic depressive illness. *Int Pharmacopsychiatry.* 1978;13(4):193-208.

38. Peet M, Peters S. Drug-induced mania. *Drug Saf.* 1995;12(2):146-53.
39. Legault M, Wise RA. Injections of N-methyl-D-aspartate into the ventral hippocampus increase extracellular dopamine in the ventral tegmental area and nucleus accumbens. *Synapse.* 1999;31(4):241-9.
40. Mogenson GJ, Nielsen M. A study of the contribution of hippocampal-accumbens-subpallidal projections to locomotor activity. *Behav Neural Biol.* 1984;42(1):38-51.
41. Peleg-Raibstein D, Feldon J. Effects of dorsal and ventral hippocampal NMDA stimulation on nucleus accumbens core and shell dopamine release. *Neuropharmacology.* 2006;51(5):947-57.
42. Kugaya A, Sanacora G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr.* 2005;10(10):808-19.
43. Soeiro-de-Souza MG, Henning A, Machado-Vieira R, Moreno RA, Pastorello BF, da Costa Leite C, et al. Anterior cingulate Glutamate-Glutamine cycle metabolites are altered in euthymic bipolar I disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(12):2221-9.
44. Haarman BC, Burger H, Doorduyn J, Renken RJ, Sibeijn-Kuiper AJ, Marsman JB, et al. Volume, metabolites and neuroinflammation of the hippocampus in bipolar disorder - A combined magnetic resonance imaging and positron emission tomography study. *Brain Behav Immun.* 2016;56:21-33.
45. López-Muñoz F, Rubio G, González-Martínez E, Álamo C. Ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA): pharmacological, clinical, and criminological aspects *Trastornos Adictivos.* 2014;6(1):22.
46. Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sévigny J, Braun N. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal.* 2005;1(3):259-70.
47. Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal.* 2005;1(2):193-204.
48. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000;362(4-5):299-309.
49. Adinolfi E, Lisa Giuliani A, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: a main player in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2017.
50. Di Virgilio F. ATP as a death factor. *Biofactors.* 1998;8(3-4):301-3.
51. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):177-92.
52. Boison D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(1):2-7.
53. Machado-Vieira R, Soares JC, Lara DR, Luckenbaugh DA, Busnello JV, Marca G, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled 4-week study on the efficacy and safety of the purinergic agents allopurinol and dipyridamole adjunctive to lithium in acute bipolar mania. *J Clin Psychiatry.* 2008;69(8):1237-45.
54. Machado-Vieira R. Purinergic system in the treatment of bipolar disorder: uric acid levels as a screening test in mania. *J Clin Psychopharmacol.* 2012;32(5):735-6.
55. Bartoli F, Crocarno C, Mazza MG, Clerici M, Carrà G. Uric acid levels in subjects with bipolar disorder: A comparative meta-analysis. *J Psychiatr Res.* 2016;81:133-9.
56. Bartoli F, Carrà G, Clerici M. Update on bipolar disorder biomarker candidates: what about uric acid/adenosine hypothesis? *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(2):105-6.
57. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol.* 2016;213:8-14.
58. Logan RW, McClung CA. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience.* 2016;321:163-88.
59. Valvassori SS, Rezin GT, Ferreira CL, Moretti M, Gonçalves CL, Cardoso MR, et al. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. *J Psychiatr Res.* 2010;44(14):903-9.

## Figure Legends

**Figure 1. Modulatory effects of P2X7R on locomotor behavior in the model of mania induced by AMPH treatment.** Effect of chronic i.p. administration of the non-selective P2X7R antagonist BBG (45 mg/kg, once a day, 7 days) on locomotor behavior, in a mouse model of mania induced by chronic (2 mg/kg, i.p., once a day, 7 days) AMPH treatment. **(a)** Total distance traveled (m). **(b)** Distance traveled by time. Except for the first 10 min, the co-treatment of BBG and AMPH causes a decrease in the distance traveled compared to the group AMPH, significant decrease at times 1200-1800s, 1800-2400s, 2400-3000s ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$  respectively). AMPH was able to increase locomotion significantly at all times in comparison to the control group (at all times:  $p < 0.0001$ , except 0-600s:  $p < 0.01$ ) and the BBG group (for all times:  $p < 0.0001$ , except 0-600s:  $p < 0.001$ ). The group co-treated with AMPH and BBG had a significant increase in locomotion compared to control groups (for all time:  $p < 0.001$ , except 600 - 1200s:  $p < 0.01$ , 1200 - 1800s:  $p < 0.01$ ) and BBG (for all times:  $p < 0.001$ , except 600 - 1200s:  $p < 0.05$ , 1200 - 1800s:  $p < 0.01$ ). **(c)** Mean speed (m/s). **(d)** Mean speed by time. Except for the first 10 min, co-treatment of BBG and AMPH causes a decrease in mean velocity compared to the AMPH-only group, ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.01$ , respectively). The AMPH was able to increase mean speed significantly at all times compared to the control group (at all times:  $p < 0.0001$ , except 0-600s:  $p < 0.05$ ) and the BBG group (for all time:  $p < 0.0001$  except 0-600s:  $p < 0.01$ ). The group co-treated with AMPH and BBG had a significant increase in mean velocity compared to control groups at times 0-600s, 600-1200s, 1800-2400s, 2400-3000s ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.01$  respectively) and BBG (for all time:  $p < 0.001$ , except 600-1200s, 1200-1800s, 1800-2400s:  $p < 0.01$ ). **(e)** Total time immobile (s). **(f)** Time immobile by time. We observed a decrease in immobility time in the AMPH group compared to the control group (at all times:  $p < 0.001$ , except 600 - 1200s:  $p < 0.05$ ) and in comparison to BBG group in the times 600-1200s ( $p < 0.05$ ), 1200-1800s, 1800-2400s, 2400-3000s ( $p < 0.0001$  for such comparisons). **(g)** Total distance traveled for the first 5 min of test (m). **(h)** Rearing (number of presses). Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post hoc test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.01$  for comparisons to BBG group. Data expressed as means  $\pm$  SEM of eight to nine animals per group. AMPH, D-amphetamine; BBG, brilliant blue G.

**Figure 2. Modulatory effects of P2X7R on monoamines response in the model of mania induced by AMPH treatment.** Effect of chronic i.p. administration of the non-selective P2X7R antagonist BBG (45 mg/kg, once a day, 7 days) on monoamines response, in a mouse model of mania induced by chronic (2 mg/kg, i.p., once a day, 7 days) AMPH treatment. **(a)** Dopamine determination in striatum. **(b)** DOPAC determination in hippocampus and in **(c)** striatum. **(d)** 5-HT determination in hippocampus and in **(e)** striatum. **(f)** Glutamate determination in hippocampus and in **(g)** striatum. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post hoc test:

\*p<0.05, \*p<0.01, \*\*\*p<0.001; #p<0.01 for comparisons to BBG group. Data expressed as means± SEM of eight to nine animals per group. *AMPH*, D-amphetamine; *BBG*, brilliant blue G. *DOPAC*, Ácido 3,4-diidroxifenilacético; *5-HT*, 5-hidroxitriptamina.

**Figure 3. Correlation between hippocampal DOPAC levels and total distance traveled (m).** Pearson correlation test. *DOPAC*, Ácido 3,4-diidroxifenilacético.

**Figure 4. Analysis of gene expression in total RNA isolated from mice hippocampus.** Effect of chronic i.p. administration of the non-selective P2X7R antagonist BBG (45 mg/kg, once a day, 7 days) on gene expression response, in a mouse model of mania induced by chronic (2 mg/kg, i.p., once a day, 7 days) AMPH treatment. Analysis of the relative expression of (a) P2RX7, (b) TH, (c) DAT, (d) ENTPD1, (e) ENTPD3 and (f) NT5E.  $\beta$ -Actin expression was used as internal control for normalization of expression levels. Two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test: \*p<0.05. Data expressed as means ± SD of five to seven animals per group. *AMPH*, D-amphetamine; *BBG*, brilliant blue G; RQ, relative quantification; P2RX7, Purinergic Receptor P2X7; TH, Tyrosine Hydroxylase; DAT, Dopamine Transporter; ENTPD1, Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1; ENTPD3, Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 3; NT5E, Ecto-5'-Nucleotidase.

**Figure 5. Blood serum purine levels ( $\mu$ M) measured by high pressure liquid chromatography (HPLC).** Effect of chronic i.p. administration of the non-selective P2X7R antagonist BBG (45 mg/kg, once a day, 7 days) on serum purine levels, in a mouse model of mania induced by chronic (2 mg/kg, i.p., once a day, 7 days) AMPH treatment. Trans-cardiac blood was collected for each mouse 30min after the last injection. (a) ATP levels. (b) ADP levels. (c) AMP levels. (d) Adenosine levels. (e) Inosine levels. (f) Xanthine levels. (g) Hypoxanthine levels. (h) Uric acid levels. Two-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* test: \*p<0.05, \*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Data expressed as means± SEM of five to seven animals per group. *AMPH*, D-amphetamine; *BBG*, brilliant blue G.

**Table 1.** Primers used in Real Time PCR experiments.

<b>Primer</b>	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>
<b>P2RX7</b>	5'-ACCAAGGTCAAAGGCATAGCA- 3'	5'-CTGCAAAGGGAAGGTGTAGTCT- 3'
<b>TH</b>	5'-CATCTCTGGGGGCTTCAGATG- 3'	5'-GTAAGCCTTCAGCTCCCCAT- 3'
<b>DAT</b>	5'-TGGCCATGGTGCCCATTTAT- 3'	5'-CACCTCCCCTCTGTCCACTA- 3'
<b>ENTPD1</b>	5'-AGCTGCCCCTTATGGAAGAT- 3'	5'-TCAGTCCCACAGCAATCAAA- 3'
<b>ENTPD3</b>	5'-ACCTGTCCCCTGCTTAAATG- 3'	5'-AGACAGAGTGAAGCCCCTGA- 3'
<b>NT5E</b>	5'-CAGGAAATCCACCTTCCAAA- 3'	5'-AACCTTCAGGTAGCCCAGGT- 3'
<b>ACTB</b>	5'-GTGACGTTGACATCCGTAAAGAC- 3'	5'-TGCTAGGAGCCAGAGCAGTAA- 3'

Standard curves were measured for each primer set and cDNA sample in order to verify reaction efficiency and Melting curve analysis was performed to determine the specificity for each real-time PCR reaction. **P2RX7** – Purinergic Receptor P2X7; **TH** – Tyrosine Hydroxylase; **DAT** – Dopamine Transporter; **ENTPD1** – Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1; **ENTPD3** - Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 3; **NT5E** – Ecto 5'-Nucleotidase; **ACTB** –  $\beta$ -Actin.

**Figure 1.**

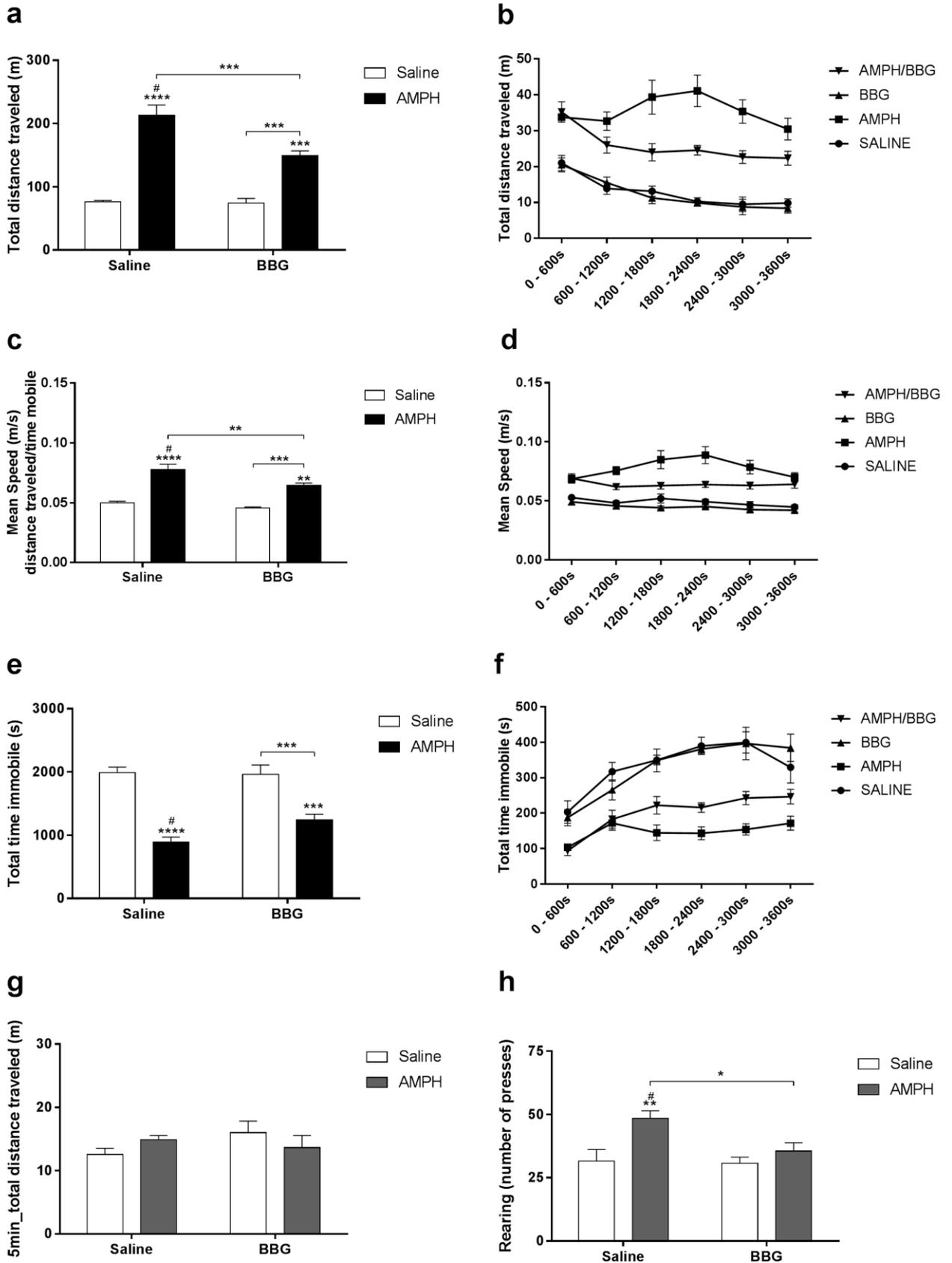


Figure 2.

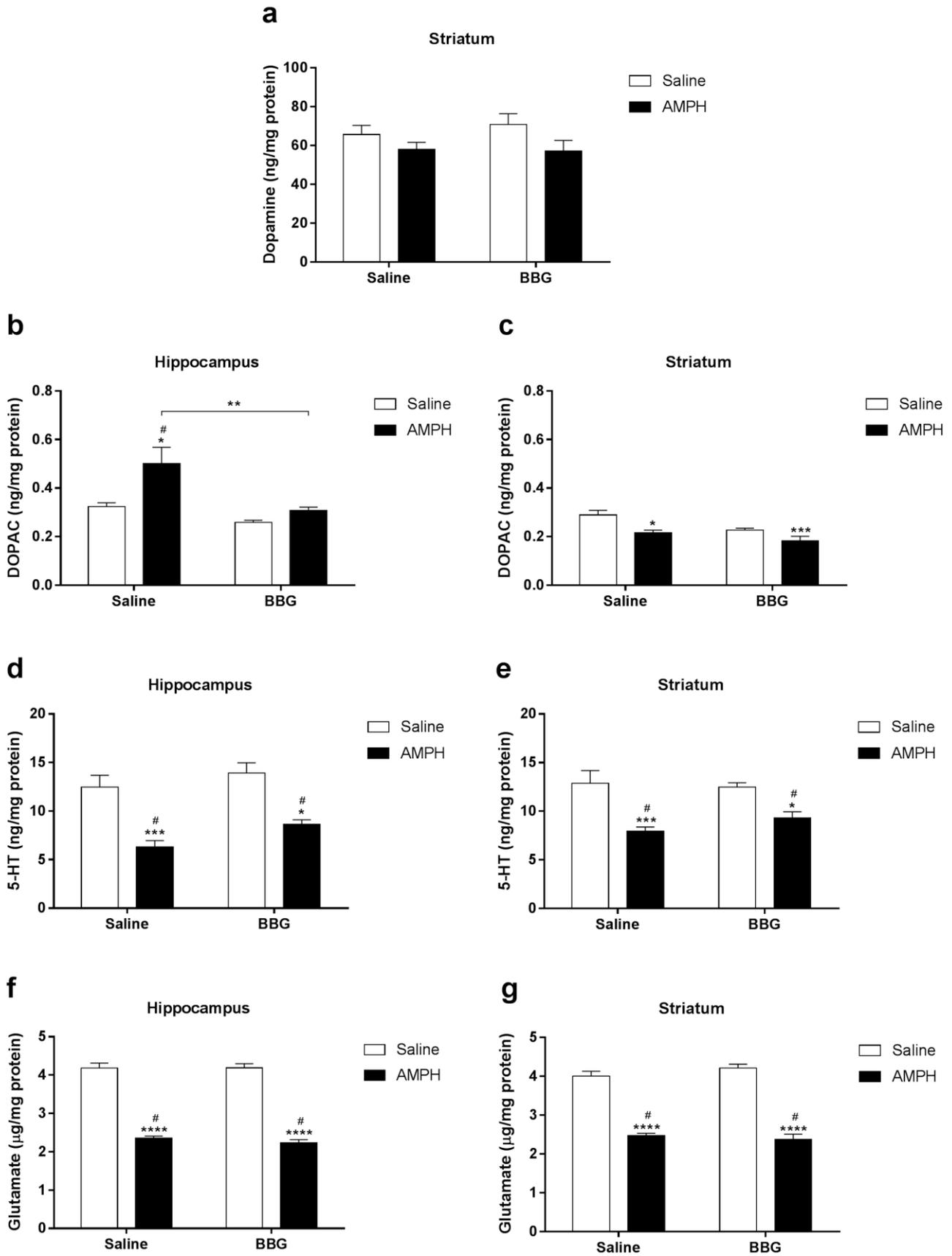
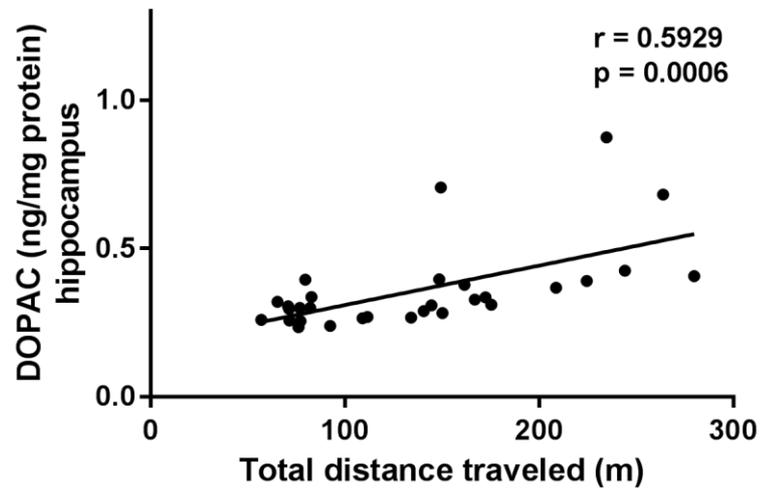


Figure 3.



**Figure 4.**

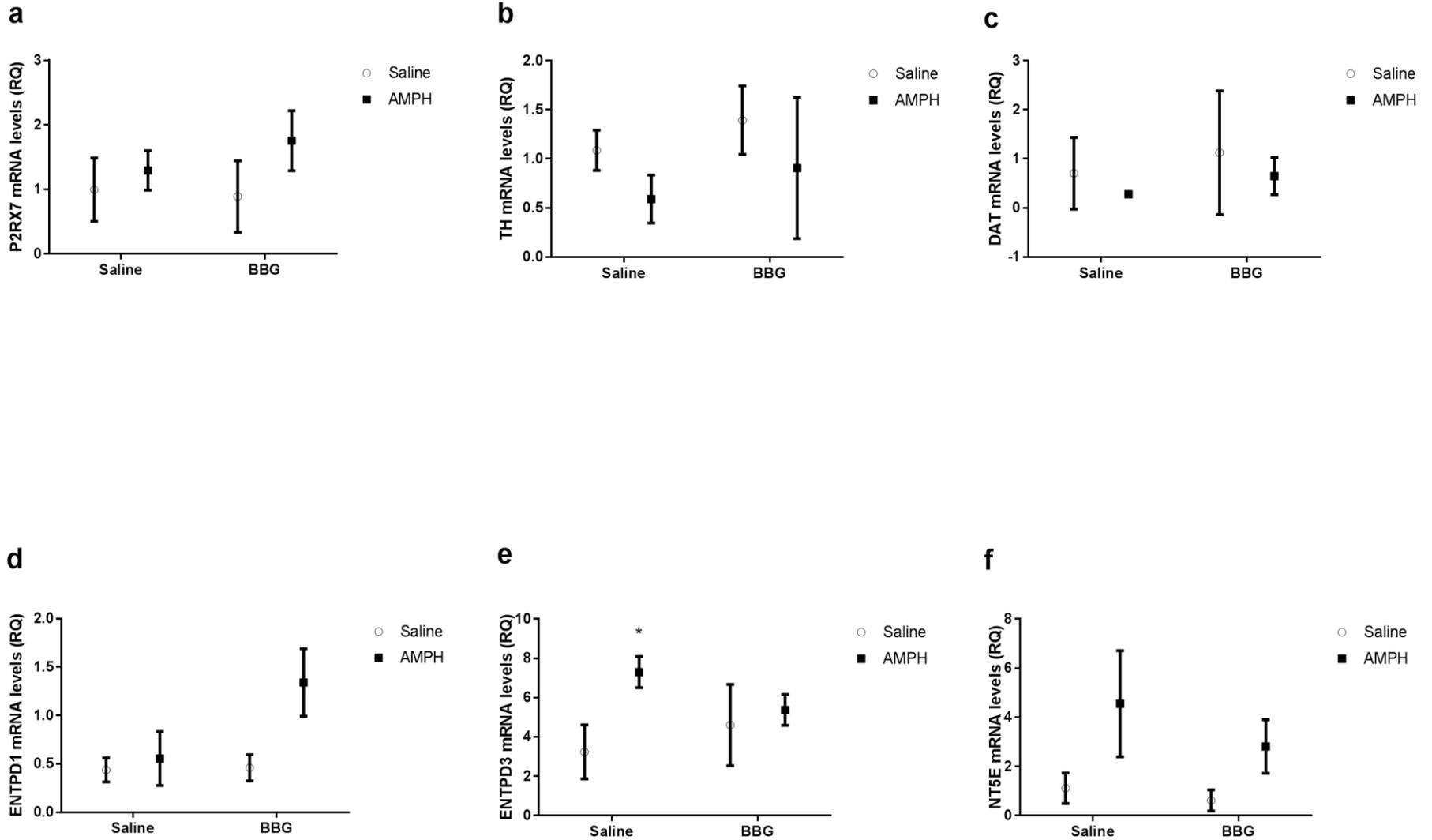
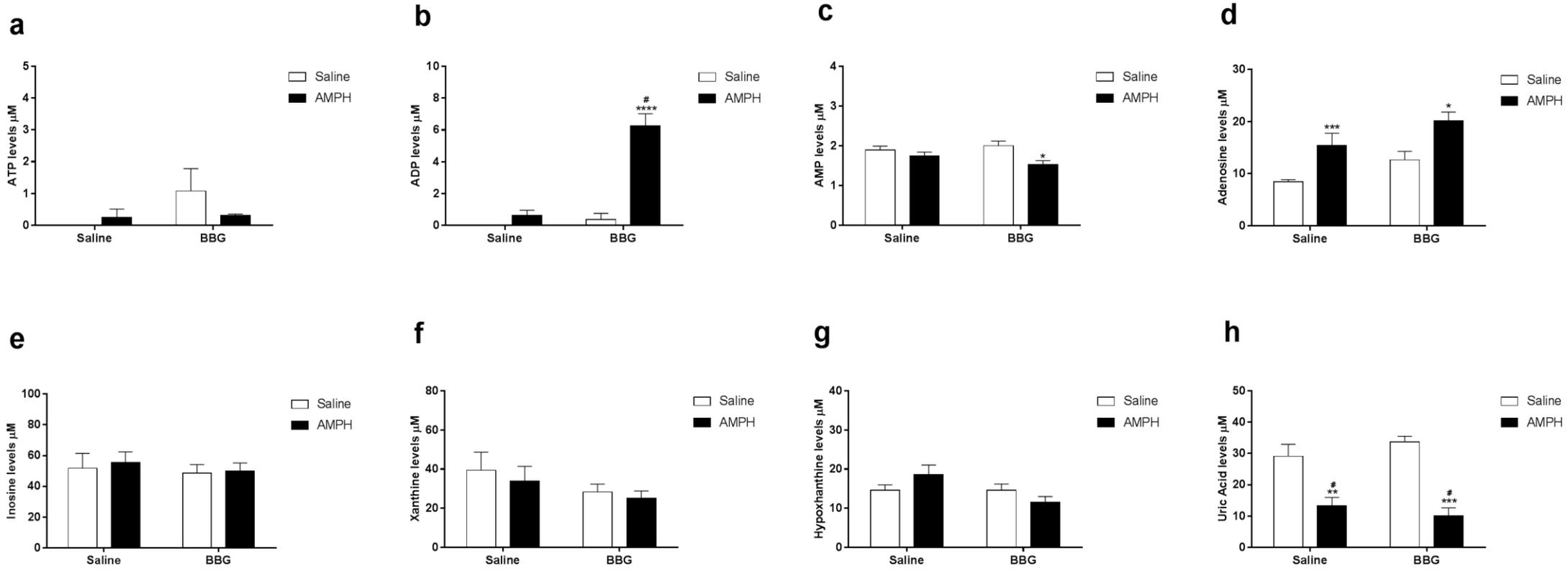


Figure 5.



## **Capítulo 4**

### **Análise da ação neuroprotetora do lítio frente à modulação purinérgica em linhagens neuronal e microglial**

Carolina Gubert, Roberta Andrejew, Fabrício Figueiró, Letícia Bergamin, Flávio Kapczinski, Pedro Vieira da Silva Magalhães, Ana Maria Oliveira Battastini.

Status: **Resultados preliminares**

**Análise da ação neuroprotetora do lítio frente à modulação purinérgica em  
linhagens neuronal e microglial**

Carolina Gubert<sup>1</sup>, Roberta Andrejew<sup>1</sup>, Fabrício Figueiró<sup>1</sup>, Letícia Bergamin<sup>1</sup>, Flávio Kapczinski<sup>2</sup>, Pedro Vieira da Silva Magalhães<sup>3</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, MacMaster University, Hamilton, Canada

<sup>3</sup>Bipolar Disorder Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal Rio Grande do Sul, 90035-903 RS, Brazil

## **Introdução**

O lítio possui destaque no tratamento do transtorno bipolar (TB), ele possui uma longa aplicação clínica, sendo utilizado há mais de 50 anos, principalmente por ser um medicamento seguro para manter o estado eutímico do paciente, em especial naqueles que têm um alto risco de cometer suicídio (Geddes and Miklowitz, 2013). Apesar da sua vasta utilização na clínica médica, os mecanismos de ação do lítio ainda não estão bem estabelecidos, algumas possibilidades estudadas são a estabilização e regulação do balanço eletrolítico nos neurônios monoaminérgicos, via penetração na membrana celular ou ainda a ação do lítio sobre a GSK3 $\beta$  (Bielecka and Obuchowicz, 2008, Wang et al., 2013).

Mesmo em diferentes metodologias e parâmetros empregados, os achados sobre a ação neuroprotetora do Lítio são consistentes (Rowe and Chuang, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram neuroproteção em diversas linhagens celulares, como células granulares cerebelares, células corticais cerebrais, neurônios hipocâmpais (Nonaka et al., 1998), células PC12 (Bournat et al., 2000) e em células de neuroblastoma, tanto de roedores quanto de humanos (Bijur et al., 2000). Foi visto ainda que o pré-tratamento com níveis terapêuticos de lítio protegeu neurônios da excitotoxicidade glutamatérgica, mediada pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Nonaka et al., 1998). Por outro lado, em estudos clínicos, pacientes com TB que não estavam fazendo uso de lítio tiveram reduções significativas nas contagens de células gliais quando comparados com aqueles sob tratamento (Bowley et al., 2002). Dessa maneira, o lítio parece agir tanto

em células neuronais quanto em glias, embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos.

O P2X7R tem sido descrito como um componente essencial da indução de ativação microglial, uma vez que a microglia apresenta alta expressão deste receptor, e quando ativada, via P2X7R, a microglia aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 e TNF- $\alpha$ ) e desencadeia uma resposta inflamatória (Bours et al., 2006, Di Virgilio, 2007, Suzuki et al., 2004). Consequente à ativação microglial ocorre a liberação de ATP pelos astrócitos, ativando purinoreceptores P2X7, P2Y1 ou P2Y2 levando a um quadro de astrogliose, que envolve aumento da proliferação celular, crescimento excessivo e de hiperplasticidade (Roszek and Czarnecka, 2015). Ainda, estudos anteriores que possuem o enfoque mais purinérgico mostraram que o lítio possui um efeito neuroprotetor contra a morte neuronal induzida pelo ATP extracelular, podendo estimular a mitogênese e a proliferação celular (Lemmens et al., 1996) e, também, que o lítio pode proteger o hipocampo contra lesões em diferentes tipos de modelos de isquemia (Nonaka and Chuang, 1998, Cimarosti et al., 2001).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que o lítio preveniu a morte celular induzida por ATP em fatias de hipocampo, verificando ainda o envolvimento do P2X7R nessa morte celular (Wilot et al., 2007). Embora este trabalho tenha sido bastante esclarecedor, uma vez que fatias de hipocampo mantem a complexidade e diversidade celular, não foi possível identificar em qual tipo celular o lítio estava atuando. Ademais, resultados de nosso grupo mostraram que o lítio foi capaz de aumentar a hidrólise do ATP e do AMP em sinaptossomas de hipocampo de ratos

tratados cronicamente com lítio (Wilot et al., 2007), indicando uma possível ação deste fármaco sobre as ectonucleotidasas.

Diante desta conjuntura da necessidade de compreensão do mecanismo de ação do lítio e considerando ainda os estudos que sugerem que o sistema purinérgico pode estar envolvido com a já estabelecida ação neuroprotetora deste fármaco, o objetivo do presente capítulo é melhor compreender a ação neuroprotetora do lítio frente à indução da morte induzida por ATP em linhagem neuronal e frente à ativação celular em linhagem microglial.

## **Materiais e métodos**

### **Materiais**

RPMI 1640, *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM), penicilina/streptomicina, solução tripsina/EDTA, e fungizona foram adquiridas da Gibco (Gibco®/Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil)). O soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) e o soro de cavalo (SC) foi adquirido da LGC standards (United Kingdom, UK). O lítio foi utilizado na formulação de Cloreto de Li (LiCl) e o ATP foram adquiridos da Sigma Aldrich (Merck Group, St Louis, MO, USA). A avaliação dos níveis de nitrito foi realizada com o uso do kit comercial para a reação de Greiss (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### **Cultura celular**

#### **N9**

As células N9 são células microgliais originárias de camundongo e foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Rafael Zanin (Universidade LaSalle). Elas foram mantidas em

meio de RPMI e suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado a 56°C por 30min, 10,000 Units/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomicina e 250 µg/mL de anfotericina B. Elas foram mantidas em um ambiente umidificado, em 5% de gás carbônico e à 37°C.

## **PC12**

As células PC12 são células neuronais originárias de feocromocitoma de rato e foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Alexander Henning (IQ, USP). Elas foram mantidas em meio de DMEM e suplementadas com 10% de SFB, 5% de soro de cavalo, ambos inativados a 56°C por 30min, 10,000 Units/mL de penicilina e de estreptomicina, 10,000 µg/mL de estreptomicina e 250 µg/mL de anfotericina B. Elas foram mantidas em um ambiente umidificado de 5% de gás carbônico e à 37°C.

Inicialmente, as células PC12 e N9 foram mantidas em uma garrafa de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> para proliferarem. O meio de cultivo é substituído 3 vezes por semana e, quando as células atingiram a confluência de 90%, elas foram tripsinizadas, contadas e, então, semeadas em placas de 24 poços para posterior tratamentos.

As células foram observadas, durante todos os experimentos, no microscópio óptico invertido Nikon Diaphot Inverted Microscope, Phase Contrast 2 Elwd 0.3.

## **Tratamentos**

Para os tratamentos, as células PC12 foram semeadas em  $2,2 \times 10^4$  células, em 500 µL, por poço, enquanto que as células N9 foram semeadas em  $3 \times 10^4$  células ou  $5 \times 10^4$  células, em 500 µL, por poço, ambas em placa de 24 poços.

As células foram tratadas com 1 mM de lítio, tendo em conta que essas concentrações representam os níveis terapêuticos no sangue dos pacientes tratados com esse medicamento (Young and Woods, 1996).

A determinação da concentração de ATP utilizada foi decorrente de uma curva para a PC12 (**Figura 1a**) e de dados prévios (Sun and Chen, 1998) e para a N9, proveniente de dados anteriores (Xiang et al., 2006). O tratamento foi realizado 48 horas após a semeadura em placas de 24 poços e os experimentos foram executados 24 horas após os tratamentos e também 90 min após os tratamentos para a N9, quando indicado. Ainda, para os tratamentos com a linhagem N9 houve restrição prévia de soro de 2h (**Esquema 1**).

### **Contagem celular em hemocitômetro**

A fim de avaliar o impacto dos tratamentos sobre o número de células, foi realizada a contagem celular em hemocitômetro. Brevemente, as células em placa de 24 poços, após o tempo de tratamento foram lavadas com tampão CMF, tripsinizadas e diluídas em solução de azul de tripan, com o intuito de serem marcadas as células que estão em processo de morte, com a membrana não-integra, o que permite a entrada e marcação do corante. Uma vez que em hemocitômetro, somente as células não coradas são contadas, esta avaliação nos indica somente as células viáveis, representadas por % de células viáveis em relação ao controle.

## **Citometria (anexina/Pi)**

Com o intuito de determinar o tipo de morte foi realizado a análise de morte celular por citometria de fluxo utilizando o equipamento *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences) com marcação de anexina-FITC e iodeto de propídio (PI). Rapidamente, após o tempo determinado de tratamento, o sobrenadante e as células pós tripsinização foram devidamente identificadas em tubos de citometria, centrifugada a 200g por 6min. As células foram contadas no citômetro e separadas em alíquotas de  $1 \times 10^5$  células. Pós nova centrifugação nas mesmas condições as células foram ressuspensas em tampão de anexina com anexina conjugada à FITC e PI quando adequado. Após uma incubação de 15min a T°C ambiente, as amostras foram adquiridas no citômetro. Os dados foram posteriormente analisados, utilizando o software FlowJo® (USA).

## **Imunoconteúdo do P2X7R**

As células PC12 e N9 foram semeadas em placas de 6 poços e após os devidos tratamentos, as análises por citometria de fluxo para determinação do imunoconteúdo do receptor foi realizado com anticorpo específico para o P2X7R. Um total de  $3 \times 10^5$  células foram centrifugadas e incubadas com tampão (FBS 1% (v/v), azida sódica 0,09% (m/v) em PBS) contendo o anticorpo P2X7R-FITC. As células foram incubadas durante 30 min a 4°C, protegidas da luz. O controle do isotipo foi realizado utilizando o controle de ligação inespecífico. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes e imediatamente adquiridas utilizando o equipamento *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences). Os dados foram posteriormente analisados, utilizando o software FlowJo® (USA).

### **Atividade das ectonucleotidases**

Para determinação da atividade das enzimas do sistema purinérgico, após o estabelecimento das culturas *in vitro*, as células foram lavadas com meio de incubação livre de fosfato, constituído de tampão Hepes 20 mM,  $\text{CaCl}_2^{2+}$  ou  $\text{MgCl}_2^{2+}$  2,0 mM, KCl 5,0 mM, NaCl 120 mM, glicose 10 mM, com o pH a 7,4. Em seguida, as células foram incubadas no mesmo meio descrito acima, contendo (concentração final): ATP ou ADP 3 mM para as células PC12 e 2 mM para as células N9, ou ainda AMP 2,0 mM para ambas as linhagens, como substratos. Depois do tempo de incubação, determinado pela padronização, para cada linhagem, a reação foi parada retirando-se uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  que foi transferida para tubos contendo 150  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 10%, previamente mantidos no gelo. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi medido pelo método do Verde de Malaquita (Chan et al., 1986), usando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como padrão. O Pi não enzimático, liberado pela hidrólise espontânea dos nucleotídeos no meio de incubação sem células, foi subtraído do total de Pi liberado durante a incubação. Após a determinação de proteínas, a atividade específica foi expressa em nmol Pi/min/mg de proteína.

### **Determinação de proteínas**

As células nas placas de 24 poços foram solubilizadas com 100  $\mu\text{L}$  NaOH 1 M e mantidas em *freezer* por até 7 dias. Posteriormente, foram descongeladas, raspadas, homogeneizadas e, então, retirado uma amostra de 50  $\mu\text{L}$ , cuja quantidade de proteínas foi determinada pelo método do Coomassie Blue (Bradford, 1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

## **Determinação de Citocinas**

A determinação de citocinas foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o *cytometric bead array (CBA) mouse inflammation kit* (IL-6, IL-10, MCP-1) (R&D Systems). Rapidamente, as *beads* de captura revestidas com anticorpo para IL-6, IL-10, MCP-1 foram aplicadas a uma placa de 96 poços. Na placa foi adicionada a curva padrão e as amostras, incubadas por 3h e então incubadas por mais 2h com o anticorpo de detecção PE-conjugado; ambas as incubações foram à temperatura ambiente e protegidas da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas e submetidas à citometria de fluxo utilizando o equipamento *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences).

## **Nitrito**

A avaliação dos níveis de nitrito ( $\text{NO}^{-2}$ ) nos indica indiretamente a produção de óxido nítrico (NO), em função de este ser um metabólito estável do NO e ser considerada um bom marcador de ativação microglial (Nahman et al., 2012). Foi utilizado um *kit* comercial para a determinação dos níveis de nitrito, utilizando a reação de Greiss. Rapidamente, mistura-se partes iguais de N-(1-naftil) etilenodiamina (Componente A) e ácido sulfanílico (Componente B) para o estabelecimento da reação de Greiss. Adiciona-se o reagente à amostra, pós incubação de 30 min à temperatura ambiente e protegido da luz, lê-se em espectrofotômetro a 548nm. Uma curva padrão de nitrito é utilizada para o cálculo e seu alcance vai de 1 – 100  $\mu\text{M}$ . Após a determinação de proteínas, os dados são expressos como  $\text{NO}^{-2}/\text{mg}$  de proteína.

## **Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® 5.0 para Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Em todos os testes foi considerada significância estatística com valores menores ou iguais a 0,05 em um intervalo de confiança de 95%.

## **Resultados**

### **O lítio é capaz de prevenir a morte induzida por ATP nas células PC12**

Inicialmente foi realizada uma curva de ATP a fim de determinar a concentração de ATP a ser utilizada nos decorrentes experimentos, capaz de induzir uma perda consistente de células viáveis. Podemos observar que todas as concentrações de ATP de 300 $\mu$ M a 5mM causaram uma significativa diminuição na porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle (para todas as comparações  $p < 0,0001$ , exceto para ATP 300 $\mu$ M vs Controle  $p < 0,001$ ) (**Figura 1**). Com o intuito de demonstrar a ação do ATP sobre as células PC12 que justificam a escolha da concentração de 3mM de ATP para os experimentos futuros, imagens por microscopia óptica das células pós tratamento são mostradas na **Figura 2**. Podemos observar que o tratamento com 1mM e 3mM de ATP visivelmente diminuem o número de células, sendo que 3mM de ATP parece causar mais danos ao corpo celular. De maneira muito interessante o ATP parece causar um aumento dos prolongamentos neuríticos, sendo mais proeminente também no tratamento com 3mM de ATP.

A **Figura 3** representa o efeito do lítio 1 mM sobre a resposta das células PC12 ao tratamento com ATP 3mM. Analisando a porcentagem de células viáveis (**Figura 3a**),

podemos observar que o tratamento das células PC12 somente com lítio causa um aumento significativo na viabilidade celular em comparação ao controle ( $p < 0,01$ ), já o tratamento com ATP na concentração de 3mM, é capaz de diminuir significativamente a porcentagem de células viáveis em comparação ao controle e ao grupo lítio ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$  respectivamente). O co-tratamento com lítio e ATP por sua vez foi capaz de prevenir a diminuição da viabilidade ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo ATP. Ainda realizamos o experimento de citometria com marcação com anexina e PI para determinar o tipo de morte celular que poderia estar ocorrendo (**Figura 3b e c**). Podemos observar a ação do ATP 3mM de aumento na porcentagem de apoptose total quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e quando comparado ao grupo lítio ( $p < 0,05$ ). O co-tratamento de lítio e ATP foi capaz de prevenir este aumento ( $p > 0,05$  comparado ao controle).

#### **A ação do lítio não parece ser sobre o imunoconteúdo de P2X7R nem sobre a atividade das ectonucleotidasas**

A **Figura 4** representa a análise do imunoconteúdo do P2X7R. Não foi encontrada nenhuma diferença sobre a porcentagem de células positivas (**Figura 4a**) ou ainda sobre a intensidade de fluorescência (**Figura 4b**) em nenhum dos tratamentos.

A partir da padronização da técnica de ensaio enzimático da atividade de hidrólise do ATP, ADP e AMP (dados não mostrados) foi decidido utilizar a incubação por 20 min com 3mM de ATP e de ADP e de 30 min com 2mM de AMP. A **Figura 5** representa a atividade das ectonucleotidasas nas células PC12 observadas a partir da hidrólise do ATP (**Figura 5a**), ADP (**Figura 5b**) e AMP (**Figura 5c**). Nenhuma diferença significativa foi observada.

## **Células N9 respondem à ativação por LPS e IL4**

Primeiramente analisamos a capacidade das células N9 em responder à ativação por LPS ou IL-4. A **Figura 6** mostra o conteúdo de citocinas no sobrenadante das células N9 pós 24h de tratamento com LPS e IL4. Nenhuma diferença estatística foi observada para os níveis de IL6 pós tratamentos (**Figura 6a**). Em relação aos níveis da citocina pró-inflamatória MCP1, houve um aumento significativo com o tratamento com LPS em relação ao controle ( $p < 0,01$ ), sendo este ainda maior que o tratamento com IL4 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 6b**). O tratamento com IL4 por sua vez foi capaz de aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória IL10 em relação ao controle ( $p < 0,01$ ) e em relação ao tratamento com LPS ( $p < 0,05$ ) (**Figura 6c**).

A **Figura 7** representa a resposta das células N9 ao tratamento com LPS, e ATP. A análise de nitrito nos mostrou um aumento significativo desta produção com os tratamentos de 24h (**Figura 7 a**) com LPS tanto 100ng/mL quanto 1 $\mu$ g/mL em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente). Da mesma maneira, o tratamento com ATP 3mM foi capaz de aumentar os níveis de nitrito significativamente em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). O tratamento com LPS 1 $\mu$ g/mL apontou ainda níveis aumentados de nitrito em comparação aos grupos LPS 100ng/mL ( $p < 0,01$ ), ATP 1mM ( $p < 0,001$ ) e ATP 3mM ( $p < 0,01$ ). Por fim, o grupo tratado com ATP 1mM mostrou níveis diminuídos de nitrito em comparação com o grupo LPS 100ng/mL ( $p < 0,05$ ) e ATP 3mM ( $p < 0,05$ ), justificando a escolha da concentração de 3mM de ATP para os experimentos subsequentes. No tratamento de 90 min (**Figura 7b**) com LPS 1 $\mu$ g/mL, não foi possível observar aumento significativo dos

níveis de nitrito ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, o tratamento de 90 min com ATP foi capaz de aumentar os níveis de nitrito ( $p < 0,01$ ).

### **ATP é capaz de ativar as células N9 potencialmente via P2X7R e o lítio não é capaz de prevenir esta ativação**

A **Figura 8** representa a resposta das células N9 ao lítio quando ativadas por ATP e pelo agonista seletivo do P2X7R, o BzATP. A análise de nitrito nos mostrou um aumento significativo desta produção após os tratamentos com ATP ( $p < 0,001$ ) e BzATP ( $p < 0,005$ ) em relação ao controle. O tratamento com lítio por sua vez não foi capaz de prevenir esta ativação uma vez que o co-tratamento com ATP (ou com BzATP) mais lítio, a produção de nitrito não foi alterada ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente).

### **O lítio não modula o imunoconteúdo de P2X7R**

A **Figura 9** representa a análise do imunoconteúdo do P2X7R nas células N9. Não foi encontrada nenhuma diferença sobre a porcentagem de células positivas (**Figura 9a**) ou ainda sobre a intensidade de fluorescência (**Figura 9b**) em nenhum tratamento.

## DISCUSSÃO

A compilação dos resultados deste capítulo nos mostra primeiramente e de maneira muito importante, o estabelecimento de dois modelos celulares fundamentais para nosso trabalho, um modelo de origem neuronal (células PC12) e outro microglial (células N9). Nas células PC12 o ATP foi capaz de diminuir a viabilidade celular, sendo o lítio capaz de prevenir essa ação. Por outro lado, de maneira muito interessante, o ATP, via P2X7R, foi capaz de ativar as células N9 e o tratamento com lítio não foi capaz de prevenir esta ação.

Em altas concentrações de ATP, como estas que utilizamos, já é bem estabelecido que o ATP causa efeitos citotóxicos (Lemmens et al., 1996), principalmente em células provenientes do SNC (Nishida et al., 2012, Sun and Chen, 1998). Em um trabalho mais recente, realizado em neurônios corticais de ratos, propõe uma cascata sequencial de morte neuronal via ATP, onde primeiramente há a ativação do receptor P2X7, seguido de aumento do influxo de  $Ca^{2+}$ , disfunção mitocondrial que culmina em apoptose induzida por caspase seguida de necrose (Nishida et al., 2012). Um importante trabalho na área demonstrou da mesma forma a ação do ATP sobre a morte celular por apoptose e necrose em células neuronais cerebelares e cultura hipocampal organotípica (Amadio et al., 2002). Dessa maneira, nossos resultados de diminuição de viabilidade celular e de aumento da apoptose pelo tratamento com ATP estão de acordo com o que se observa para a ação do ATP em células neuronais.

Um achado relevante nesse trabalho, embora seja qualitativo, foi a observação microscópica das células PC12, que apresentaram um aumento proeminente no prolongamento de neuritos pós o tratamento por 24h com 1 e 3 mM de ATP. Já foi demonstrado anteriormente que também a adenosina e a guanosina podem afetar

positivamente o crescimento de neuritos nas células PC12 (Gysbers and Rathbone, 1992). Na literatura foi relatado que as células PC12 quando estimuladas com a forma solúvel da ecto-5'-nucleotidase apresentaram um aumento considerável no comprimento de neuritos, após 24 horas (Heilbronn and Zimmermann, 1995), bem como já foi visto que o envolvimento desta ectonucleotidase é crítico para formação de neuritos induzidos pelo fator de crescimento neural (NGF), e a sua expressão aumenta durante a maturação, a migração e o crescimento nessas células (Zimmermann, 1996). Corroborando esses achados, o inibidor da atividade da ecto-5'-nucleotidase, AMPCP, tem um efeito inibitório na formação dos neuritos (Heilbronn and Zimmermann, 1995). A partir dos dados demonstrados da literatura, podemos hipotetizar que esta alteração pode ser decorrente da estimulação da ecto-5'-nucleotidase, que está localizada por toda a superfície celular das células PC12 (Heilbronn and Zimmermann, 1995), bem como pela formação da molécula neuroprotetora adenosina, produto da atividade desta enzima, com o intuito de minimizar os danos causados pelo tratamento com ATP. De qualquer maneira, essa observação nos induziu a escolher a concentração de ATP de 3mM, uma vez que esta foi a que de maneira microscópica modificou mais a morfologia celular.

De maneira geral o tratamento com lítio demonstra proteger neurônios de danos induzidos por diferentes insultos (Shao et al., 2005, Cui et al., 2007). Já foi observado a ação do lítio em inibir a produção de peróxido de hidrogênio induzido pela liberação de citocromo c e inibir a ativação das caspases 2 e 3 em diferentes culturas neuronais (Schäfer et al., 2004, Cui et al., 2007). Ainda, tem sido demonstrado que o tratamento com lítio pode prevenir o dano oxidativo induzido por modelo farmacológico de mania em animais (Frey et al., 2006, Corrêa et al., 2007). A contínua investigação dos mecanismos de ação do lítio no organismo deve ser realizada, visto que é um fármaco

de longa aplicação clínica, sendo utilizado há mais de 50 anos (Geddes and Miklowitz, 2013). A resolução desse problema poderia ser a chave para o melhor estabelecimento da neurobiologia do transtorno bipolar e de mecanismos biológicos que estão presentes, também, em outras desordens psiquiátricas.

A ação do lítio nas células sobre a prevenção de dano causado pelo ATP nas células PC12 é um dado que corrobora estudos anteriores do nosso grupo, onde foi demonstrado que este fármaco preveniu a morte celular induzida por ATP em fatias de hipocampo de rato (Wilot et al., 2007). Nosso estudo acrescenta principalmente a análise por tipo celular envolvido nesse efeito, uma vez que em fatias de hipocampo temos toda a complexidade celular interagindo; assim, no presente estudo buscamos compreender a ação do ATP sobre células neuronais e microgliais em separado. Para as células PC12 foi possível observar a ação preventiva do lítio sobre o tratamento com o ATP, dado que corrobora a ação neuroprotetora bem estabelecida do lítio, indicando que o que fora observado previamente em fatias de hipocampo deva-se de maneira importante a uma proteção neuronal.

A fim de investigar de que maneira o lítio estaria agindo sobre as células PC12 de maneira a proteger da morte induzida pelo ATP, analisamos o imunoconteúdo de P2X7R, já que o ATP é o ativador deste receptor. Não observamos nenhuma diferença significativa, o que nos indica que não é via modulação molecular do P2X7R que o lítio está agindo. Com o mesmo intuito, avaliamos a atividade das ectonucleotidases e da mesma maneira não encontramos nenhuma diferença na hidrólise de nenhum nucleotídeo, o que também nos indica que a ação do lítio não é via atividade específica das enzimas de hidrolisam os nucleotídeos. Este achado vai de encontro ao já reportado no nosso laboratório, onde observamos o aumento da hidrólise do ATP e do AMP em sinaptossomas de hipocampo de ratos tratados cronicamente com lítio (Wilot et al.,

2007), o que nos indica que o modelo experimental talvez seja o fator determinante dessa discrepância.

As células microgliciais são células que respondem rapidamente a insultos, isso tem sido demonstrado em cultura primária de células e em linhagens celulares, principalmente em resposta ao tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) (Nakamura et al., 1999). A produção de nitrito, como um marcador de ativação microglial tem sido amplamente utilizada (Moss and Bates, 2001, Nahman et al., 2012), assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias para o mesmo objetivo (Nahman et al., 2012). Neste sentido, nosso modelo celular de microglia N9, reproduziu achados anteriores de resposta ao LPS com aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e produção de nitrito e resposta à citocina IL4 com aumento dos níveis de citocina anti-inflamatória, confirmando nosso modelo celular microglial como responsivo aos moduladores M1 e M2 respectivamente (Liu et al., 2012). Esses resultados em conjunto com o aumento dos níveis de nitrito com o tratamento com 24h de LPS, indicando ativação microglial, nos reforça a boa responsividade deste modelo celular e legitimou o uso das células N9 para os experimentos subsequentes.

O tratamento com ATP por 24h foi capaz de aumentar os níveis de nitrito destas células, indicando que nessas condições, as células N9 respondem ao ATP de maneira a tornarem-se ativadas. Esta reação das N9 ao ATP já havia sido sugerida por um estudo que demonstrou que o ATP poderia ser um bom ativador microglial, ampliando as possibilidades de estudos (Xiang et al., 2006). Baseado neste mesmo trabalho, investigamos ainda a ação do ATP e LPS sobre as células microgliciais após 90 min de tratamento, uma vez que foi mostrada a ação do ATP como ativador microglial neste curto tempo de ação (Xiang et al., 2006). Nossos resultados corroboram o estudo anterior, de fato o ATP é capaz de ativar as células nesta resposta rápida, o interessante

foi que o LPS, clássico ativador microglial não foi capaz de realizar o mesmo feito, indicando que talvez o ATP seja mais eficaz em respostas agudas de insulto.

Demonstramos ainda, de maneira muito interessante, que com o uso de um agonista seletivo do P2X7R, o BzATP, os níveis de nitrito também são aumentados, indicando que a ativação microglial observada é via ativação do P2X7R. O Tratamento com lítio por outro lado, não foi capaz de prevenir a ativação microglial induzida pelo ATP, indicando que a ação deste fármaco em proteger dos efeitos do ATP é neuronal e não microglial.

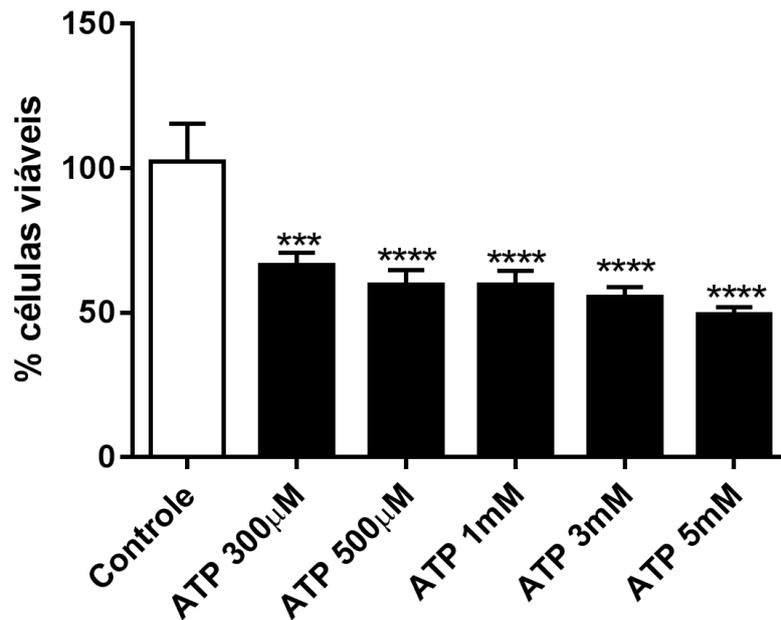
De maneira geral, as células de diferentes origens neurais, tanto neuronais quanto microgliais são responsivas ao ATP, no sentido de excitotoxicidade e ativação respectivamente. O lítio por sua vez modula a resposta nas células PC12 prevenindo a morte celular induzida pelo ATP. Por outro lado, nas células N9 o lítio não foi capaz de prevenir a ativação via P2X7R induzida pelo ATP. Mais estudos são necessários para melhor caracterizar o envolvimento do sistema purinérgico na resposta celular ao ATP e melhor investigar a ação do lítio sobre esse insulto.

## Referências

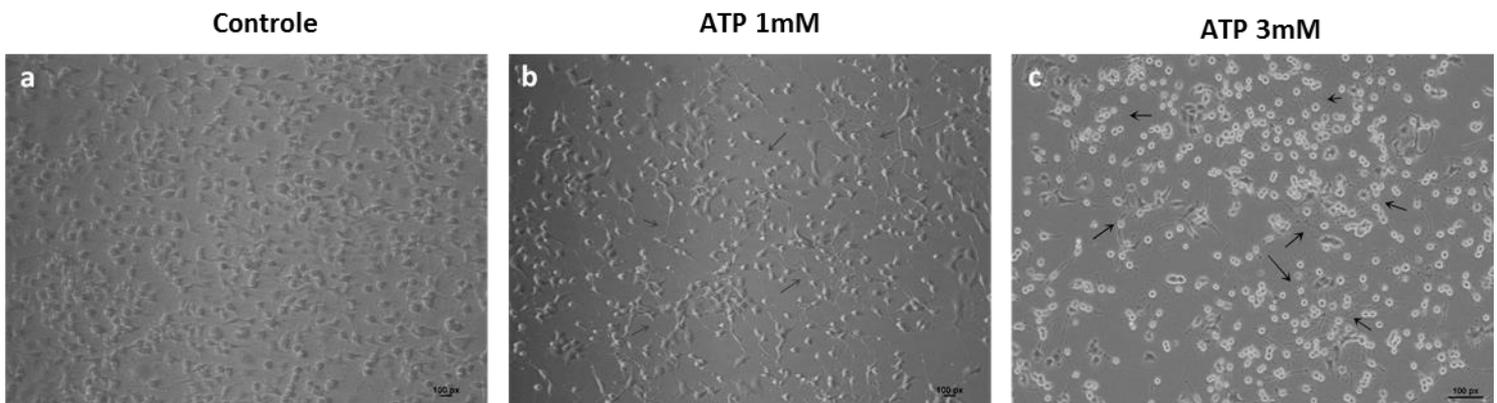
- Amadio, S., D'Ambrosi, N., Cavaliere, F., Murra, B., Sancesario, G., Bernardi, G., Burnstock, G. and Volonté, C. (2002) 'P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons', *Neuropharmacology*, 42(4), pp. 489-501.
- Bielecka, A. M. and Obuchowicz, E. (2008) 'Antiapoptotic action of lithium and valproate', *Pharmacol Rep*, 60(6), pp. 771-82.
- Bijur, G. N., De Sarno, P. and Jope, R. S. (2000) 'Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium', *J Biol Chem*, 275(11), pp. 7583-90.
- Bournat, J. C., Brown, A. M. and Soler, A. P. (2000) 'Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappaB in PC12 cells', *J Neurosci Res*, 61(1), pp. 21-32.
- Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. and Dagnelie, P. C. (2006) 'Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation', *Pharmacol Ther*, 112(2), pp. 358-404.
- Bowley, M. P., Drevets, W. C., Ongür, D. and Price, J. L. (2002) 'Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder', *Biol Psychiatry*, 52(5), pp. 404-12.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Chan, K. M., Delfert, D. and Junger, K. D. (1986) 'A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> - stimulated ATPase activity', *Anal Biochem*, 157(2), pp. 375-80.
- Cimarosti, H., Rodnight, R., Tavares, A., Paiva, R., Valentim, L., Rocha, E. and Salbego, C. (2001) 'An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation', *Neurosci Lett*, 315(1-2), pp. 33-6.
- Corrêa, C., Amboni, G., Assis, L. C., Martins, M. R., Kapczinski, F., Streck, E. L. and Quevedo, J. (2007) 'Effects of lithium and valproate on hippocampus citrate synthase activity in an animal model of mania.', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31(4), pp. 887-91.
- Cui, J., Shao, L., Young, L. T. and Wang, J. F. (2007) 'Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate', *Neuroscience*, 144(4), pp. 1447-53.
- Di Virgilio, F. (2007) 'Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome', *Trends Pharmacol Sci*, 28(9), pp. 465-72.
- Frey, B. N., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Martins, M. R., Petronilho, F. C., Bardini, K., Dal-Pizzol, F., Kapczinski, F. and Quevedo, J. (2006) 'Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania.', *J Psychiatry Neurosci*, 31(5), pp. 326-32.
- Geddes, J. R. and Miklowitz, D. J. (2013) 'Treatment of bipolar disorder', *Lancet*, 381(9878), pp. 1672-82.
- Gysbers, J. W. and Rathbone, M. P. (1992) 'Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells', *Neuroreport*, 3(11), pp. 997-1000.
- Heilbronn, A. and Zimmermann, H. (1995) '5'-nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells', *Eur J Neurosci*, 7(6), pp. 1172-9.
- Lemmens, R., Vanduffel, L., Teuchy, H. and Culic, O. (1996) 'Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes', *Biochem J*, 316 ( Pt 2), pp. 551-7.

- Liu, H. C., Zheng, M. H., Du, Y. L., Wang, L., Kuang, F., Qin, H. Y., Zhang, B. F. and Han, H. (2012) 'N9 microglial cells polarized by LPS and IL4 show differential responses to secondary environmental stimuli', *Cell Immunol*, 278(1-2), pp. 84-90.
- Moss, D. W. and Bates, T. E. (2001) 'Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function', *Eur J Neurosci*, 13(3), pp. 529-38.
- Nahman, S., Belmaker, R. H. and Azab, A. N. (2012) 'Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells', *Innate Immun*, 18(3), pp. 447-58.
- Nakamura, Y., Si, Q. S. and Kataoka, K. (1999) 'Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide', *Neurosci Res*, 35(2), pp. 95-100.
- Nishida, K., Nakatani, T., Ohishi, A., Okuda, H., Higashi, Y., Matsuo, T., Fujimoto, S. and Nagasawa, K. (2012) 'Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death', *J Neurochem*, 122(6), pp. 1118-28.
- Nonaka, S. and Chuang, D. M. (1998) 'Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats', *Neuroreport*, 9(9), pp. 2081-4.
- Nonaka, S., Katsube, N. and Chuang, D. M. (1998) 'Lithium protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, phenytoin and carbamazepine', *J Pharmacol Exp Ther*, 286(1), pp. 539-47.
- Roszek, K. and Czarnecka, J. (2015) 'Is Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase)-based Therapy of Central Nervous System Disorders Possible?', *Mini Rev Med Chem*, 15(1), pp. 5-20.
- Rowe, M. K. and Chuang, D. M. (2004) 'Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications', *Expert Rev Mol Med*, 6(21), pp. 1-18.
- Schäfer, M., Goodenough, S., Moosmann, B. and Behl, C. (2004) 'Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells', *Brain Res*, 1005(1-2), pp. 84-9.
- Shao, L., Young, L. T. and Wang, J. F. (2005) 'Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells', *Biol Psychiatry*, 58(11), pp. 879-84.
- Sun, A. Y. and Chen, Y. M. (1998) 'Extracellular ATP-induced apoptosis in PC12 cells', *Adv Exp Med Biol*, 446, pp. 73-83.
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K. and Nakata, Y. (2004) 'Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia', *J Neurosci*, 24(1), pp. 1-7.
- Wang, H. M., Zhang, T., Li, Q., Huang, J. K., Chen, R. F. and Sun, X. J. (2013) 'Inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by lithium chloride suppresses 6-hydroxydopamine-induced inflammatory response in primary cultured astrocytes', *Neurochem Int*, 63(5), pp. 345-53.
- Wilot, L. C., Bernardi, A., Frozza, R. L., Marques, A. L., Cimarosti, H., Salbego, C., Rocha, E. and Battastini, A. M. (2007) 'Lithium and valproate protect hippocampal slices against ATP-induced cell death', *Neurochem Res*, 32(9), pp. 1539-46.
- Xiang, Z., Chen, M., Ping, J., Dunn, P., Lv, J., Jiao, B. and Burnstock, G. (2006) 'Microglial morphology and its transformation after challenge by extracellular ATP in vitro', *J Neurosci Res*, 83(1), pp. 91-101.
- Young, L. T. and Woods, C. M. (1996) 'Mood stabilizers have differential effects on endogenous ADP ribosylation in C6 glioma cells', *Eur J Pharmacol*, 309(2), pp. 215-8.
- Zimmermann, H. (1996) 'Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system', *Prog Neurobiol*, 49(6), pp. 589-618.

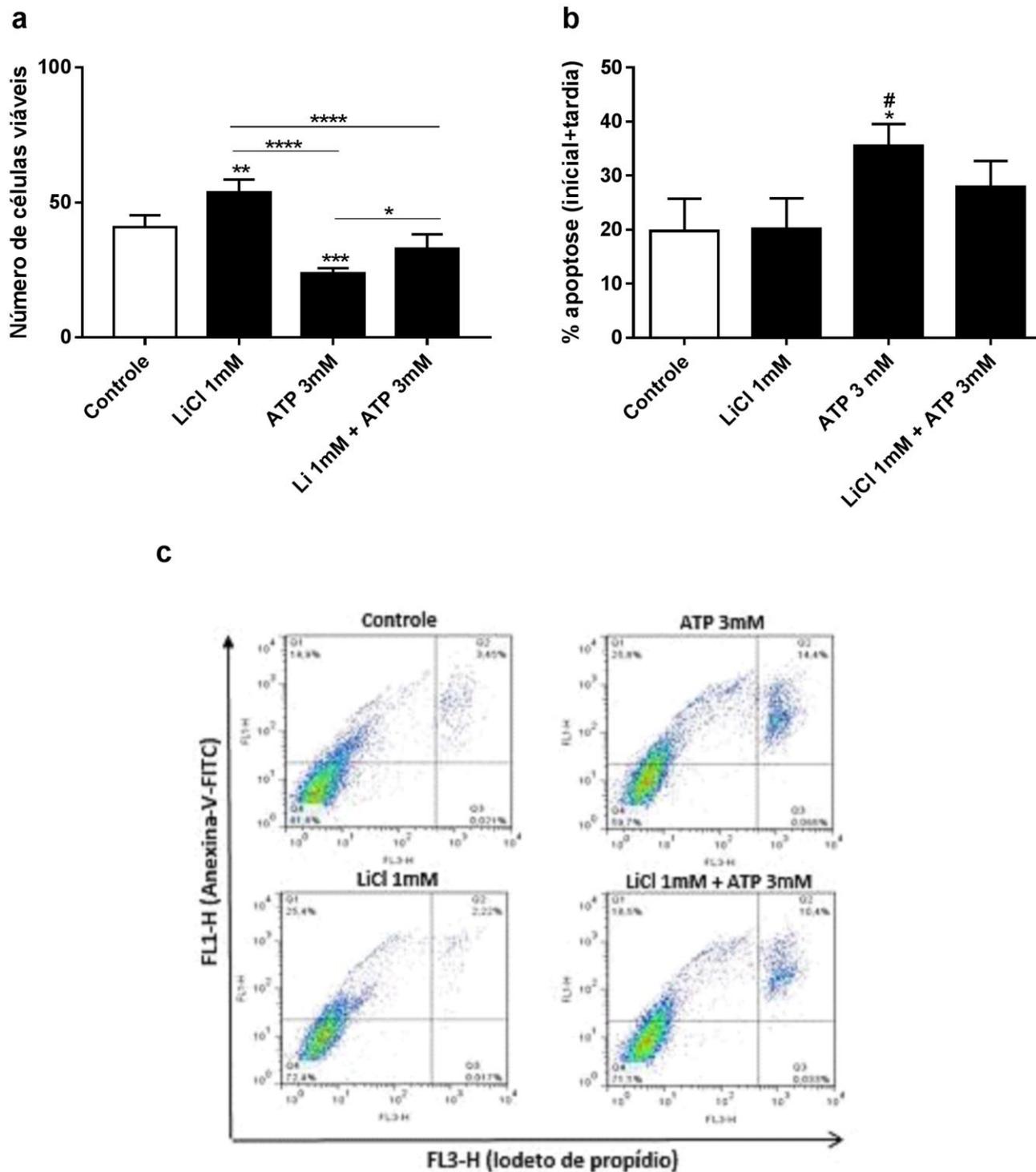




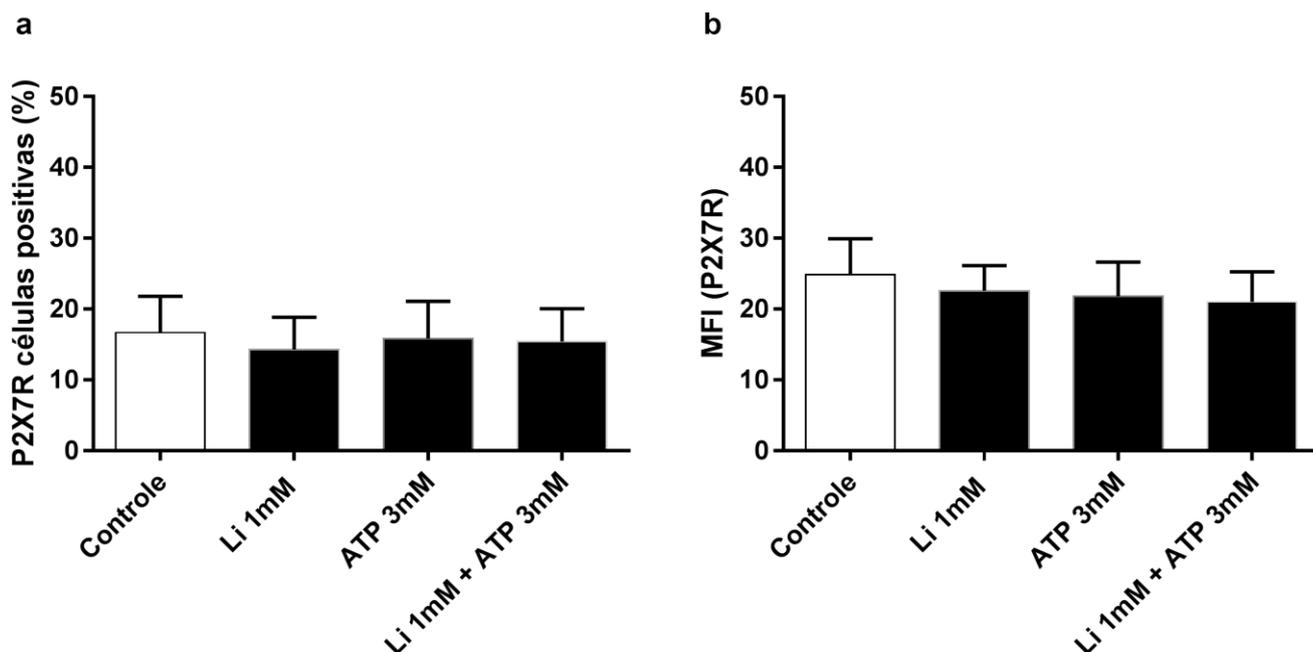
**Figura 1. Curva de concentração de ATP.** Contagem de células PC12 viáveis 24h após o tratamento com ATP. Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de n= 3 - 4 experimentos independentes. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



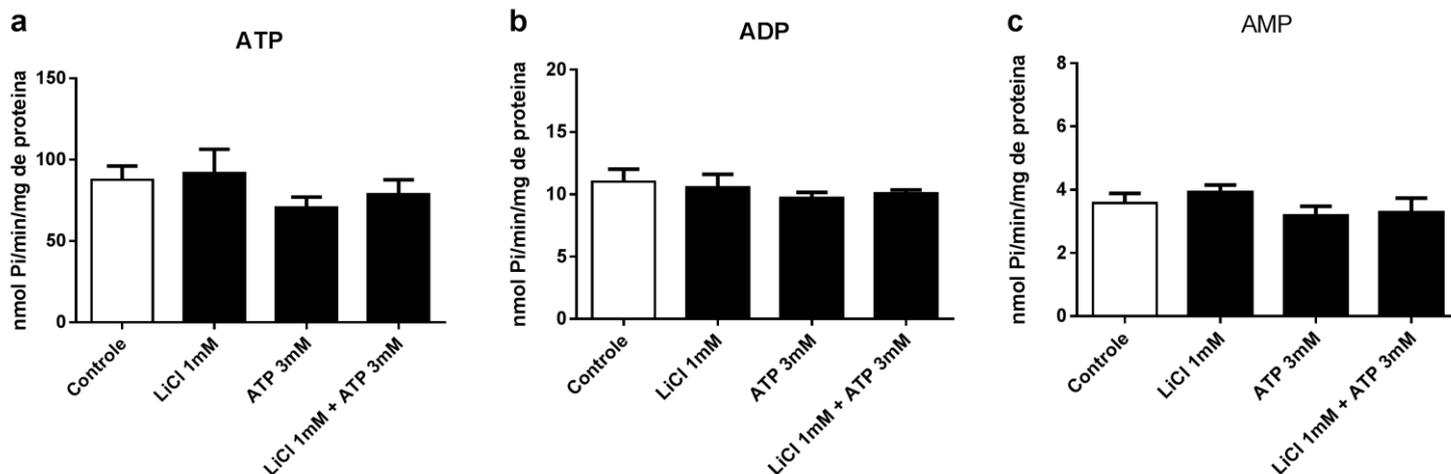
**Figura 2. Análise por microscopia óptica da resposta das células PC12 ao tratamento com ATP.** Morfologia das células (a) controle. Morfologia das células tratadas com ATP (b) 1mM e (c) 3mM. Imagens obtidas com o *Nikon Diaphot Inverted Microscope, Phase Contrast 2 Elwd 0.3*, na objetiva de 10 x. Setas: neuritos.



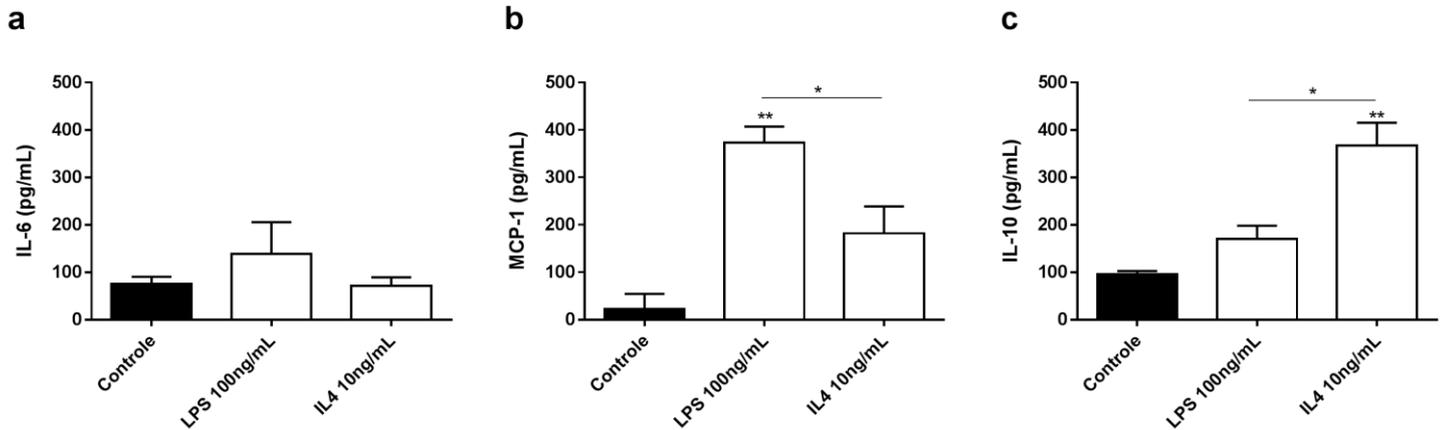
**Figura 3. Resposta das células PC12 ao tratamento com ATP e lítio. (a)** Contagem de células PC12 viáveis frente ao tratamento com lítio e 3mM ATP. **(b)** Porcentagem de apoptose total frente aos tratamentos. **(c)** Figura representativa da citometria realizada. Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de  $n = 3 - 4$  experimentos independentes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; # $p < 0.001$  para comparações com o grupo lítio 1mM. LiCl (lítio).



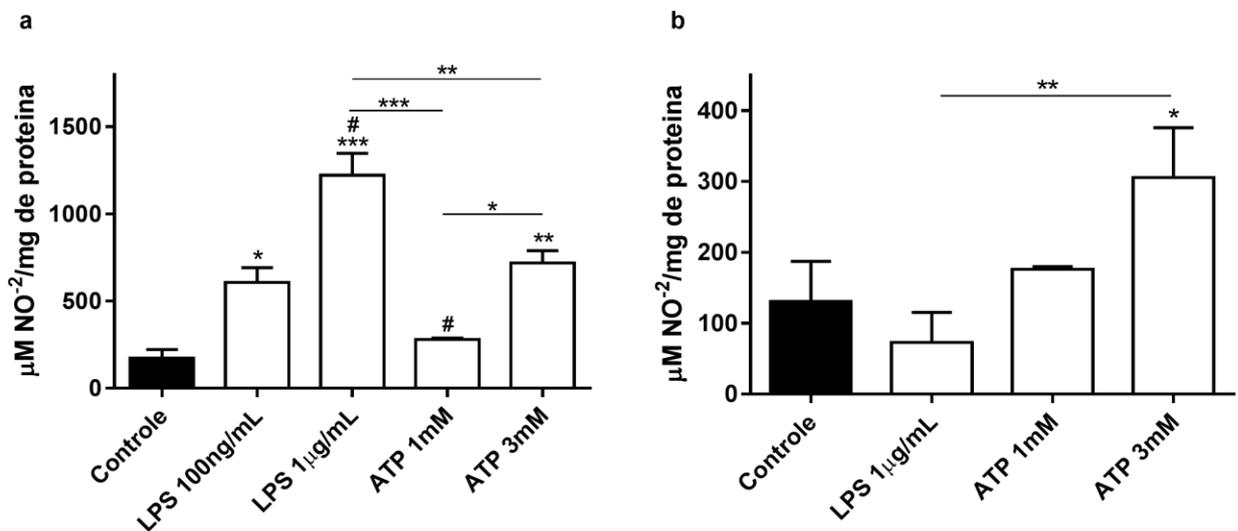
**Figura 4. Imunoconteúdo de P2X7R em células PC12 frente ao tratamento com ATP e lítio. (a)** Porcentagem de células positivas para o P2X7R. **(b)** Intensidade de fluorescência do P2X7R. Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de n= 3-4 experimentos independentes.



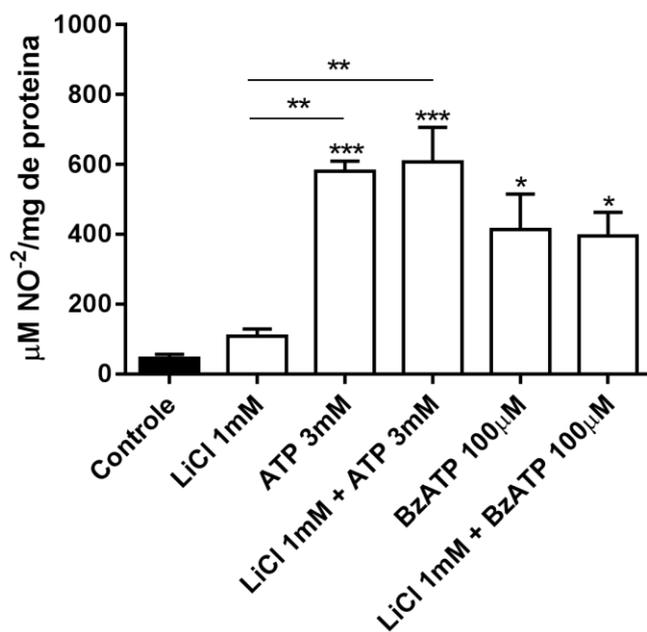
**Figura 5. Incubação enzimática das células PC12.** Atividade específica para a hidrólise de (a) ATP e (b) ADP (ambos incubados com seus respectivos substratos na concentração de 3mM durante 20 minutos) e de (c) AMP (incubado com AMP na concentração de 2mM por 30 minutos). Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de n= 3-4 experimentos independentes.



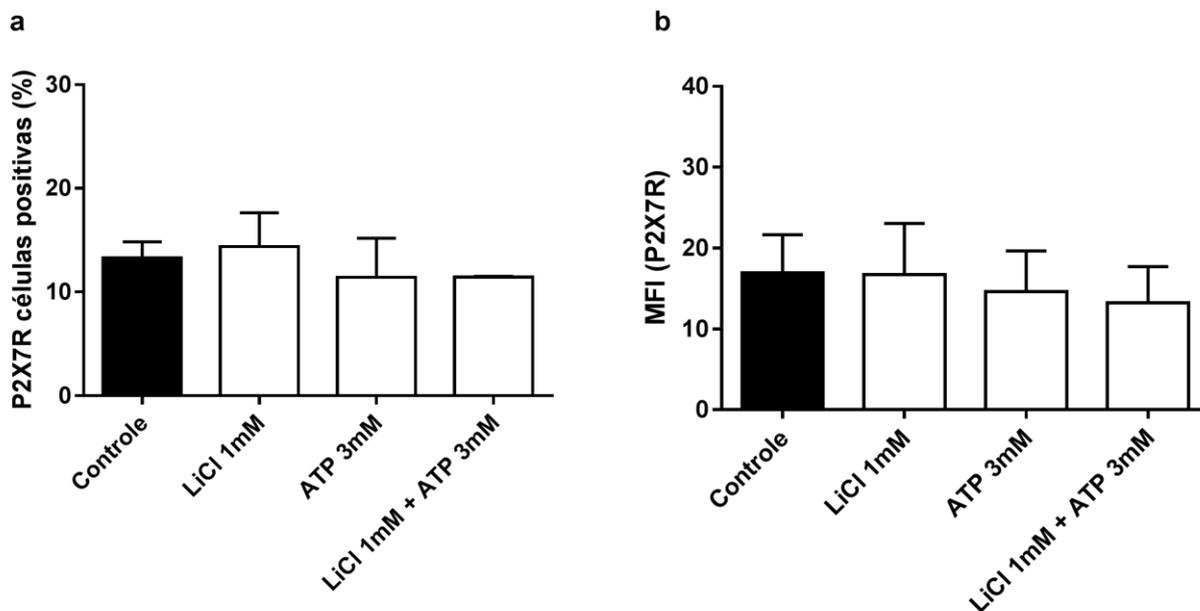
**Figura 6. Liberação de citocinas pelas células N9.** Medida da liberação de citocinas pelas células N9 pós 24h de tratamento com LPS ou IL4. (a) IL-6, (b) MCP1 e (c) IL-10. Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de n= 3 – 4 experimentos independentes. \*p<0.05, \*\*p<0.01.



**Figura 7. Resposta das células N9 ao tratamento com LPS e ATP.** Atividade da iNOS estimada pelo acúmulo de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no sobrenadante da cultura celular pós (a) 24h de tratamento com LPS ou ATP e (b) 90 min de tratamento com ATP e LPS. Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de n= 3-4 por grupo. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, # p<0.01 para comparações com o grupo LPS 100ng/mL.



**Figura 8. Resposta das células N9 ao tratamento com lítio e ATP.** Atividade da iNOS estimada pelo acúmulo de nitrito ( $\text{NO}^2$ ) no sobrenadante da cultura celular pós tratamento de 90 min com lítio e ATP. Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de  $n= 3-4$  por grupo. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ . LiCl (lítio).



**Figura 9. Imunoconteúdo de P2X7R em células N9 frente ao tratamento com ATP e lítio.** (a) Porcentagem de células positivas para o P2X7R. (b) Intensidade de fluorescência do P2X7R. Anova de uma via seguida de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média  $\pm$  DP de  $n= 3-4$  experimentos independentes. LiCl (lítio).

### **PARTE III**

## **Discussão**

A presente tese procura acrescentar à literatura e ao conhecimento científico achados sobre a fisiopatologia do transtorno bipolar, em virtude desta ser parcialmente conhecida. A preocupação em estudar o assunto está relacionada à importante prevalência deste transtorno na população e à redução na qualidade de vida que estes pacientes apresentam (Merikangas et al. 2007, Grande et al. 2016). Diante da limitada compreensão do transtorno, entendemos que estudos são necessários para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela doença, assim como compreender o mecanismo das medicações utilizadas, com o intuito de fornecer ao paciente um tratamento adequado e que de alguma maneira minimize os danos que este transtorno causa nestes indivíduos. Para isto, investigamos o envolvimento do sistema purinérgico como potencial alternativa para o entendimento da fisiopatologia do transtorno bipolar, para a sugestão de novos alvos terapêuticos e ainda para a compreensão do mecanismo de ação do fármaco mais utilizado para o tratamento.

A característica que define o transtorno bipolar é a ocorrência de mania e depressão no mesmo indivíduo. Neste caso, pode-se dizer que as primeiras descrições do transtorno bipolar datam de 400 a.c. na Grécia antiga (Angst and Marneros 2001), onde aparecem termos como melancolia (definição antiga da depressão) e mania, embora somente em 150 d.c. na Capadócia tenha sido atribuído primeiramente ambos os sintomas no mesmo paciente (Baldessarini and Tondo 2001). Em meados do século XIX, foi conceituado pelo psiquiatra/neurologista francês Jules Baillarger de “insanidade maníaco-depressiva”, ou ainda pelo psiquiatra Jean-Pierre Falret de “insanidade circular” (Pichot 2004). Esta segunda definição já considera o estado de

remissão, hoje conhecida eutímia, uma vez que descreve “intervalos lúcidos” entre os episódios agudos.

Todos os conceitos foram centralizados e redefinidos pelo psiquiatra Emil Kraepelin a partir de 1896, definições modernas que se aproximam do que conhecemos hoje por transtorno bipolar (Angst and Marneros 2001), embora este tenha sido primeiramente introduzido no Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais somente em 1987, na sua terceira edição (DSM) III (Yutzy et al. 2012). Kraepelin no seu trabalho acerca da nosologia da doença, exerceu um papel fundamental de observação dos pacientes, apontando desde sua época, preocupações à respeito do quadro clínico, acerca da funcionalidade dos indivíduos e ainda sugeriu o sistema purinérgico como rota possível de envolvimento na patologia da doença (Mondimore 2005), todas inferências exploradas nesta tese.

A partir daí, tem sido demonstrado que as taxas de recuperação funcional dos pacientes bipolares são de fato mais baixas que outras patologias crônicas, ou ainda que a depressão maior (Coryell et al. 1998). As principais áreas descritas por estarem prejudicadas nos pacientes com transtorno bipolar são a autonomia, o trabalho, a cognição, as relações interpessoais e o lazer (Rosa et al. 2010), explorando a cognição ainda, a memória, aprendizado, função executiva, atenção e concentração se destacam negativamente (Robinson et al. 2006). É importante salientar que estas observações são encontradas tanto em pacientes em episódios agudos, quanto em remissão, indicando um quadro crônico preocupante (Martínez-Arán et al. 2004). Tais deficiências cognitivas e perda da funcionalidade dos pacientes deve explicar, em parte, a colocação do transtorno bipolar como uma das dez causas de incapacitação mundial pela a

Organização Mundial da Saúde (Belmaker 2004), tornando clara a necessidade de foco de estudo, melhor entendimento e possibilidade de intervenção.

No primeiro capítulo desta tese (**Capítulo 1**) avaliamos os metabólitos do sistema purinérgico em soro de pacientes bipolares e correlacionamos com dados clínicos, em especial, parâmetros de funcionalidade. Nossos resultados primeiramente nos mostraram uma diminuição nos níveis de adenosina em pacientes em comparação a controles e uma importante correlação inversa entre os níveis de adenosina e a piora dos sintomas, nos permitindo sugerir os níveis séricos de adenosina como um possível biomarcador periférico para esta condição.

O que fora observado por Kraepelin em relação ao sistema purinérgico se resume na observação de que pacientes com gota ou hiperuricemia apresentavam humor anormal, revertido pelo tratamento com lítio (Barondes 1999). Desde então o *link* entre os níveis de ácido úrico e distúrbios de humor tem sido a base da hipótese da disfunção do sistema purinérgico para o transtorno bipolar (Machado-Vieira et al. 2002, Ortiz et al. 2015, Bartoli et al. 2016), sendo inclusive sugerido como biomarcador para o transtorno. Entretanto, nossos achados, não demonstram nenhuma diferença entre os níveis de ácido úrico e mostram uma diminuição nos níveis séricos de adenosina nos pacientes em relação aos controles.

Níveis de ácido úrico são realizados como rotina laboratorial e hospitalar, acreditamos que por este motivo, o ácido úrico tenha sido a única purina avaliada nos trabalhos citados, sendo que muitos apresentam resultados incongruentes (Albert et al. 2015). Se considerarmos ainda o fato de o Alopurinol, inibidor da xantina oxidase, seja o fármaco utilizado para gota e o mesmo que se observou reduzir sintomas maníacos em pacientes bipolares (Machado-Vieira 2012, Weiser et al. 2014) e que a sua ação

farmacológica seja aumentar os níveis de adenosina (Pacher et al. 2006), nos parece que desde o princípio o que se observou como níveis de ácido úrico foi o reflexo do que estava acontecendo com a degradação das purinas como um todo, sendo que a purina chave a ser avaliada era a adenosina. O que faz sentido quando pensamos na complexa sinalização celular possível da adenosina, sua ligação a quatro receptores diferentemente ligados a proteínas G (A1 e A3 ligadas à proteína Gi/o, responsável pela inibição da produção de AMPc, enquanto os receptores A2A e A2B estimulam a produção de AMPc via ativação da proteína Gs) e assim, cada um com suas peculiaridades de sinalização (Ralevic and Burnstock 1998). Além do mais, a adenosina no sistema nervoso central principalmente possui uma ação de destaque na neuroproteção, como moduladora da sinalização dopaminérgica, serotoninérgica e glutamatérgica indicando que possuir níveis diminuídos dessa purina não parece ser um bom prognóstico especialmente para transtornos psiquiátricos (extensivamente revisado em (Cunha 2016)).

De qualquer maneira, até onde sabemos, fomos os primeiros a demonstrar a diminuição nos níveis de adenosina em pacientes com transtorno bipolar em comparação a indivíduos saudáveis. Preocupados ainda com o quadro clínico dos pacientes, avaliamos escalas clínicas que de maneira muito interessante se correlacionaram com os níveis de adenosina de maneira inversa, são elas as escalas de depressão (HAMD-R) e de funcionalidade (FAST). Em outras palavras, demonstramos que pacientes que pontuaram mais nessas escalas e por definição estão mais deprimidos ou ainda com uma piora na funcionalidade possuem menores níveis de adenosina circulante. Ainda, quando dicotomizamos os pacientes com baixo dano de funcionalidade (FAST <25) e alto dano de funcionalidade (FAST ≥25), observamos um

ainda menor nível de adenosina, corroborando a hipótese de esta molécula vir a se tornar uma biomarcadora de piora dos sintomas.

A identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores para doenças em geral possui uma imensurável gama de aplicações (Frank and Hargreaves 2003). A alta complexidade e o pouco entendimento da fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, incluindo o transtorno bipolar, torna difícil a identificação de biomarcadores para estas doenças (Sagar and Pattanayak 2017). Mesmo assim, existe uma permanente busca de moléculas promissoras que possam contribuir para predizer, diagnosticar, prognosticar e ainda acompanhar a resposta ao tratamento, uma vez que todas estas etapas hoje em dia são baseadas somente em entrevista clínica (Sagar and Pattanayak 2017).

Neste sentido, uma série de biomarcadores são hoje estudados e sugeridos como potenciais marcadores para o transtorno bipolar, como a análise de neuroimagem funcional, que aponta uma alta ativação de estruturas do sistema límbico associado com uma baixa ativação de estruturas cognitivas para pacientes com transtorno bipolar (Chen et al. 2011). Pensando em marcadores periféricos, a diminuição dos níveis de BDNF em pacientes bipolares é bastante estudada, ainda se sugere uma associação à progressão da doença (Fernandes et al. 2011, Fernandes et al. 2015). O aumento de marcadores inflamatórios em pacientes também possui destaque, principalmente o TNF- $\alpha$  (Munkholm et al. 2013), assim como o aumento de marcadores de estresse oxidativo em pacientes, sendo eles a peroxidação lipídica, dano ao DNA/RNA e óxido nítrico (Andreazza et al. 2007, Andreazza et al. 2008). Embora amplamente estudado, todos estes potenciais candidatos ainda estão em fase de testes, sendo que nenhum até o momento está sendo aplicado na clínica, deixando em aberto a necessidade de novos

alvos e talvez uma proposta de combinação de marcadores, considerando a complexidade e heterogeneidade da doença.

De uma maneira muito interessante, o prejuízo global do indivíduo, em especial aqueles relacionados ao déficit cognitivo tem sido sugerido como um endofenótipo para o transtorno bipolar (Bourne et al. 2013). É considerado ainda que a funcionalidade cognitiva se relacione inversamente à progressão da doença, no que se refere ao número de episódios, duração da doença, número de hospitalizações, etc (Cardoso et al. 2015). Também se sugere que déficits cognitivos possam ser potenciais marcadores de resposta ao tratamento para o transtorno bipolar (Kulkarni et al. 2010, Pattanayak et al. 2012). Uma vez que nossos achados demonstraram que os níveis de adenosina não somente foram diferentes entre pacientes e controles, como também se correlacionam com a piora dos sintomas, consideramos que os níveis de adenosina possuem um interessante potencial para se tornar um útil biomarcador para o transtorno bipolar tanto para diagnóstico como para progressão da doença.

Neste mesmo sentido, com a evolução de técnicas e metodologias, uma área em especial tem crescido na busca de biomarcadores para transtornos psiquiátricos, a pesquisa genética (Sagar and Pattanayak 2017). A comunidade científica tem apostado no alto componente hereditário do transtorno bipolar (Johnson et al. 2008) para buscar novas possibilidades tanto de encontrar biomarcadores para prever e diagnosticar quanto para melhor compreender a fisiopatologia da doença. Com o intuito de contribuir com esta linha, idealizamos o segundo capítulo dessa tese baseado em um promissor alvo de investigação para o transtorno bipolar, o receptor P2X7 (P2X7R) (**Capítulo 2**).

Como já discutido anteriormente nesse capítulo, o gene deste receptor é altamente polimórfico, contendo muitos polimorfismos de nucleotídeos único (SNPs)

(Roger et al. 2010) e está situado em um locus de susceptibilidade a transtornos afetivos, como o transtorno bipolar (Dawson et al. 1995, Ewald et al. 1998, Morissette et al. 1999, Degen et al. 2001, Maziade et al. 2001, Curtis et al. 2003, Shink et al. 2005). Essas são as principais características que motivam o estudo do P2X7R em transtornos afetivos, sendo eles a depressão maior, o transtorno bipolar e transtornos de ansiedade. Estas doenças compartilham algumas características importantes que talvez seja o ponto de intersecção onde há a influencia deste receptor, como alterações no humor, em pensamentos e comportamento e importantes prejuízos sociais (Kessler et al. 2003, Somers et al. 2006). Alguns SNPs do P2X7R possuem particular interesse e foram bastante estudados, como os SNPs que conferem ganho de função ao receptor: 1405A>G (rs2230912) e 1068G>A (rs1718119) (Erhardt et al. 2007, Caseley et al. 2014).

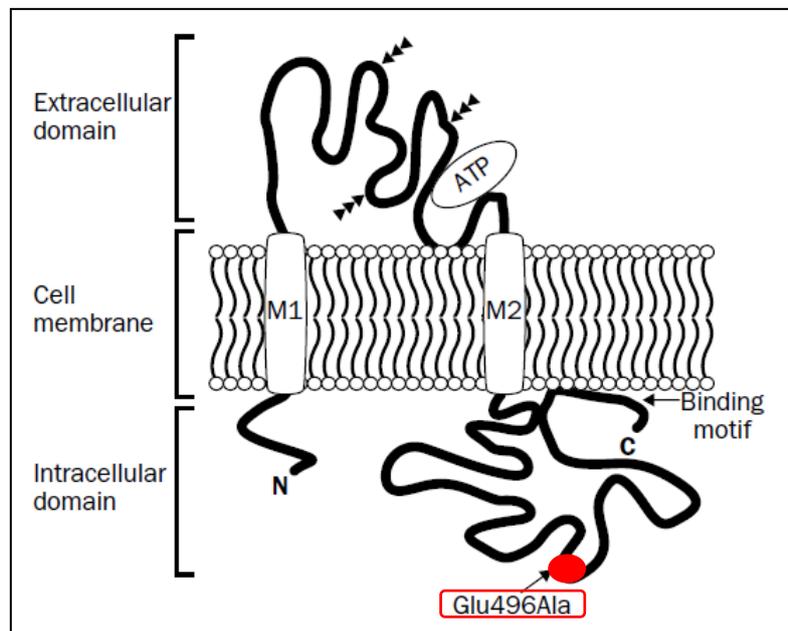
O primeiro estudo neste sentido fora em 2006, uma coorte de 231 pacientes bipolares e 214 controles que apontou uma associação do polimorfismo 1405A>G em indivíduos com transtorno bipolar (Barden et al. 2006). Este mesmo polimorfismo foi analisado em 1000 pacientes diagnosticados com depressão maior e 1019 controles e neste caso, o polimorfismo 1405A>G foi também associado com a depressão maior (Lucae et al. 2006). Estas associações foram confirmadas posteriormente por um estudo com 604 pacientes bipolares e 560 controles (McQuillin et al. 2009), seguida de outro trabalho que avaliou 171 pacientes com depressão maior e transtorno bipolar e 178 controles (Hejjas et al. 2009). Por outro lado, uma série de estudos posteriores não foram capazes de confirmar os achados anteriores, como um estudo com uma coorte de 687 pacientes bipolares, 1036 pacientes com depressão maior e 1204 controles (Green et al. 2009), ou ainda outro trabalho com 1445 pacientes bipolares e 2006 controles (Grigoriu-Serbanescu et al. 2009). Finalmente, de forma mais recente uma meta

análise com 6962 pacientes e 9262 controles provenientes de 13 estudos diferentes expos uma incongruência de dados que não permite o estabelecimento de uma associação definitiva do polimorfismo 1405A>G com transtornos de humor (Feng et al. 2014). Neste caso, mais estudos são necessários para esclarecer esta possível associação ou ainda a análise de novos SNPs que talvez sejam mais promissores.

Neste sentido, o polimorfismo do P2X7R 1513A>C (rs3751143) tem sido associado de maneira muito promissora a diferentes doenças de cunho inflamatório (Caseley et al. 2014), nos atraindo a atenção. Foi observada uma associação do polimorfismo 1513A>C com a diminuição do risco de isquemia cardíaca e acidente vascular cerebral isquêmico (Gidlöf et al. 2012), assim como com o aumento na susceptibilidade à tuberculose (Wu et al. 2014) e à osteoporose (Ohlendorff et al. 2007). Até onde temos conhecimento, nenhum estudo até o momento avaliou a frequência do polimorfismo 1513A>C no espectro de transtornos afetivos e tampouco no transtorno bipolar, tornando nosso trabalho o primeiro estudo a explorar esta possibilidade.

De maneira muito interessante, observamos uma diminuição estatística na frequência do alelo 1513C do polimorfismo do P2X7R em 154 pacientes bipolares em comparação a 184 controles, que foi refletida no potencial aumento na frequência do genótipo 1513AA e 1513AA/AC nos pacientes em relação aos controles. Uma vez que este SNP acarreta a troca do o ácido glutâmico por alanina no resíduo 496 (Glu496Ala ou E496A) na cauda carboxi terminal do receptor (**Figura 7**), modificando a capacidade de resposta do mesmo (Sanz et al. 2014), no sentido de em [AA] o receptor é normal, em [AC] 50% da atividade do receptor é diminuída e em [CC] o receptor perde totalmente a função (Gu et al. 2001, Roger et al. 2010), podemos inferir que os nossos resultados apontam para uma maior atividade do receptor P2X7 nos pacientes em

relação aos controles. Ainda avaliamos a expressão gênica do receptor, o imunoconteúdo proteico e os níveis circulantes do ativador fisiológico do mesmo (ATP) em 22 pacientes bipolares comparados a 18 controles e não encontramos nenhuma diferença, o que de uma maneira geral reforça os achados genéticos, validando a comparação da resposta do receptor em grupos com equivalente expressão, imunoconteúdo e disponibilidade de agonista.



**Figura 7. Topologia do P2X7R destacado o polimorfismo 1513A>C (Glu496Ala).** (adaptado de Wiley et al. 2002).

Considerando o que o P2X7R é um receptor com baixa afinidade ao ATP (0,1 – 1mM) (Surprenant and North 2009), sua ativação comumente se dá em situações patológicas que geram altos níveis de ATP extracelular, sendo considerado um *damage-associated molecular patterns* (DAMP) (Di Virgilio et al. 2009). Interessantemente esta categoria de moléculas associadas a dano já foi demonstrada estar aumentada em pacientes com transtorno bipolar em episódios agudos (Stertz et al. 2015), assim como

aumento de morte celular já fora reportada em pacientes bipolares (Fries et al. 2014, Pfaffenseller et al. 2014), assim como ativação microglial (Rao et al. 2010). Tem sido proposto que o ATP age como um “sinal de dano”, como em quadros inflamatórios (Lazarowski et al. 2000), amplificando o sinal de inflamação via ativação microglial capaz de levar a morte celular (Takenouchi et al. 2009), também em resposta à trauma (Nieber et al. 1999), dano celular e infecção (Lenertz et al. 2011). Dessa forma não é surpreendente a demonstração da presença do polimorfismo do P2X7R 1513A>C gerando perda de função do receptor como impedidor da liberação de citocinas pró-inflamatórias durante uma inflamação, sugerindo que possuir este polimorfismo de perda de função do P2X7R é protetivo contra efeitos citotóxicos (Wesselius et al. 2012).

Estes estudos prévios suportam a nossa hipótese de que os pacientes com transtorno bipolar apresentam uma frequência maior da forma mais ativa do receptor (uma vez que apresentam diminuição na frequência do alelo 1513C e o potencial aumento na frequência do genótipo 1513AA e 1513AA/AC em relação aos controles), o que poderia gerar uma resposta de dano maior nos indivíduos com transtorno bipolar frente à insultos, como um episódio agudo (capaz de liberar DAMPs), contribuindo para o estabelecimento de inflamação e morte celular observados no transtorno. Dessa maneira, um importante achado para o entendimento da fisiopatologia do transtorno bipolar, assim como um potencial biomarcador de predição e diagnóstico da doença foi mostrado por nossos resultados.

Baseado nos achados anteriores, procuramos no terceiro capítulo desta tese (**Capítulo 3**) explorar a relação entre o receptor P2X7 e o transtorno bipolar, principalmente neste contexto de compreensão da ativação do receptor frente à insultos. Para isso realizamos um modelo animal de mania procurando mimetizar o estado agudo

da doença e antagonizamos o P2X7R a fim de avaliar a resposta dos animais em uma situação de insulto frente à modulação do receptor, em um estado normalmente ativo e um estado farmacologicamente bloqueado. Encontramos resultados muito interessantes que corroboram a hipótese geral de que o P2X7R participa da fisiopatologia do transtorno bipolar, ainda demonstramos que a ativação do P2X7R não parece ser um bom prognóstico para indivíduos com a doença, sendo que o bloqueio farmacológico talvez seja uma alternativa interessante de opção adjunta ao tratamento farmacológico já utilizado.

De uma maneira geral, nossos resultados primeiramente corroboraram a sugerida associação entre o P2X7R e o modelo pré-clínico de mania, demonstrado pela diminuída resposta à amfetamina (AMPH) que os animais com o P2X7R bloqueado farmacologicamente apresentaram. Assim, nosso estudo está de acordo com resultados anteriores que demonstraram que o bloqueio e deleção do P2X7R interfere negativamente sobre o estabelecimento do modelo animal de mania (Bhattacharya et al. 2013, Csölle et al. 2013, Gubert et al. 2016). Entretanto, diferentemente de estudos anteriores, utilizamos uma administração crônica de um antagonista não seletivo do receptor P2X7, sempre 30 min antes da injeção de AMPH, com o intuito de modular o P2X7R em cada injeção de estabelecimento do modelo de mania. No estudo anterior do nosso grupo, embora tenhamos utilizado um antagonista seletivo do receptor, este foi administrado somente antes da última injeção de AMPH, uma vez que a injeção era intracerebroventricular (Gubert et al. 2016), o que já foi suficiente para reverter a hiperlocomção induzida pela AMPH. Neste caso, pode ser discutido que o comportamento expressou a modulação somente da última injeção de AMPH e não de todo o modelo de mania estabelecido em 7 dias de administração, o que procuramos evitar com o desenho experimental do presente trabalho.

A fim de enriquecer a análise comportamental, utilizamos ferramentas do *software* utilizado para o campo aberto para realizar algumas subanálises complementares. Pudemos observar um perfil semelhante ao da distância percorrida, na velocidade média total dos animais, onde a AMPH foi capaz de aumentar a velocidade média e o co-tratamento com *Brilliant Blue G* (BBG) é capaz de diminuir em relação ao grupo somente AMPH. Por outro lado, a análise de tempo total de imobilidade dos animais nos demonstrou que a AMPH diminui essa característica e o co-tratamento com BBG embora tenha aumentado o tempo de imobilidade, não foi capaz de reverter significativamente essa ação da AMPH. Essas análises comportamentais nos indicam que a ação do modulador do P2X7R esteja mais envolvida na movimentação do animal propriamente dita, e antagonizar o P2X7R resulte na diminuição da velocidade média do animal induzida pela AMPH, que refletirá mais diretamente sobre a distância percorrida observada.

Neste trabalho também demonstramos os comportamentos analisados no decorrer do tempo. A escolha de observação dos animais por um período total de 60min foi baseada em estudos anteriores com camundongos (Flaisher-Grinberg and Einat 2010, Flaisher-Grinberg et al. 2010, Hannah-Poquette et al. 2011) embora existam estudos que analisem tempos menores, como 5 e 10 minutos (Gould et al. 2001, Scotti et al. 2011). O que pudemos observar plotando em gráfico tempos de 10 em 10 minutos, foi que a análise de 60min parece ser a mais adequada de fato, uma vez que principalmente no caso da distância percorrida e velocidade média, nos primeiros 10min de análise, por exemplo, não houve diferença entre o grupo co-tratado com AMPH e BBG e o grupo AMPH, caso tivéssemos adotado essa medida, perderíamos resultados importantes. Podemos observar também uma espécie de reação à AMPH em forma de U invertido, sendo o pico desse padrão aparentemente em 30min, neste caso, a análise de

60min nos permite verificar toda a extensão da ação da AMPH e melhor visualizar sua modulação, uma vez que o co-tratamento com BBG parece impedir esse padrão. Essa compilação de resultados comportamentais nos ajuda a traçar um padrão comportamental oriundo do modelo de mania induzido pela administração de AMPH por 7 dias e além de compreender o envolvimento do P2X7R nesses desfechos contribui de maneira importante para a padronização do modelo.

Outra análise realizada foi a análise da distância percorrida nos primeiros 5min do comportamento de campo aberto, onde não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos. A interpretação deste primeiro momento do animal no aparato é diferente da distância percorrida total no final dos 60min que nos indica locomoção, neste caso avalia-se a exploração do animal ao ambiente novo onde foi colocado (Li et al. 2010). Já foi demonstrado previamente em estudos comparativos entre humanos e camundongos que a AMPH possui uma ação de aumentar a locomoção dos indivíduos, porém não de aumentar a exploração dos mesmos (Minassian et al. 2016), corroborando os resultados deste presente trabalho. Neste mesmo sentido, foi analisada a exploração vertical dos animais, chamada de *rearing* nestes mesmos primeiros 5min, onde pudemos observar a ação da AMPH em aumentar este comportamento, resultado de acordo com estudos anteriores (Macêdo et al. 2012), e a ação do BBG de preveni-lo. Este resultado corrobora a ação da AMPH sobre a atividade vertical de animais e sugere ainda uma ação do P2X7R neste comportamento, uma vez que quando antagonizado o comportamento não é mais observado.

De maneira inovadora ainda este estudo sugere um possível mecanismo dopaminérgico para a ação da modulação do P2X7R, uma vez que observamos o aumento dos níveis do metabólito de dopamina, a Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético

(DOPAC), induzido pelo tratamento com AMPH no hipocampo e a reversão desse aumento causado pelo tratamento com o antagonista do P2X7R. Os níveis hipocampais de DOPAC também se correlacionaram positivamente com a distância percorrida dos animais, o que poderia explicar o resultado comportamental observado.

Procuramos melhor compreender a relação entre o bloqueio do receptor e a via dopaminérgica avaliando a expressão gênica da enzima limitante da produção de dopamina, a tirosina hidroxilase e o transportador de dopamina DAT no hipocampo dos animais e acabamos por não encontrar nenhuma diferença significativa. Já foi amplamente descrito que o receptor de dopamina D2R interage com diversos receptores, formando heteroreceptores que acabam por modificar a sinalização dopaminérgica e ser importante para diversas doenças (Borrito-Escuela and Fuxe 2017). O assunto foi recentemente revisado e nenhuma menção à formação de heteroreceptores com o P2X7R foi mencionado, por outro lado, é bem estabelecido a interação entre o D2R e o receptor de adenosina A2A, resultando em uma resposta hiperdopaminérgica a partir de menores níveis de adenosina extracelular, altamente relevante para a fisiopatologia de transtornos psiquiátricos (Burnstock et al. 2011, Fuxe et al. 2014, Borrito-Escuela 2017). Assim, embora tenhamos demonstrado uma relação entre os níveis de DOPAC, o comportamento e o bloqueio do P2X7R, maiores investigações com a finalidade de entender essa modulação ainda são necessárias.

Também observamos uma interessante ação da AMPH sobre parâmetros purinérgicos centrais e periféricos. No hipocampo vimos um aumento na expressão da enzima predominantemente neuronal ENTPD3, responsável pela hidrólise do ATP extracelular (Zimmerman, 2000). Entendemos que esta seja uma resposta neuronal de proteção, uma vez que a molécula de ATP no meio extracelular pode vir a ser o “sinal

de dano” capaz de desencadear inflamação e morte celular (Adinolfi et al. 2017). Já de maneira periférica observamos o aumento dos níveis séricos de adenosina frente ao tratamento com AMPH. Da mesma forma, considerando os benefícios anti-inflamatórios e neuroprotetores da adenosina (Cekic and Linden 2016), acreditamos que seja um mecanismo de proteção para minimizar os efeitos deletérios globais da AMPH sobre os animais. Este resultado, no entanto, no primeiro momento parece vir de encontro ao que demonstramos anteriormente no **capítulo 1**, onde os níveis séricos de adenosina eram diminuídos em pacientes bipolares em comparação a controles, entretanto acreditamos que a diferença seja devido ao fato de os pacientes estarem eutímicos e o modelo mimetizar um estado agudo, além da limitação intrínseca de comparação linear entre modelo animal e estudo clínico. De qualquer maneira, pensamos que na situação do estudo com pacientes, a diminuição nos níveis de adenosina reflita um traço do transtorno e o aumento que observamos no modelo animal, uma resposta ao estado agudo.

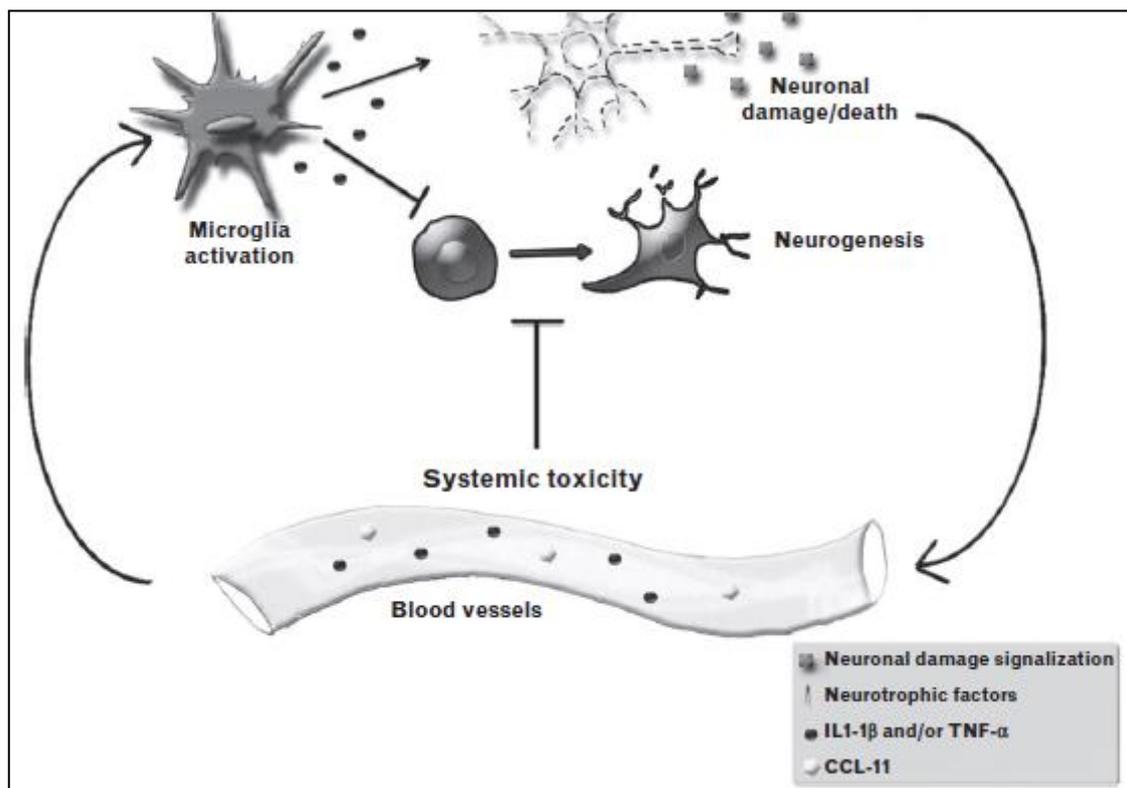
Com o intuito de não somente acrescentar conhecimento à fisiopatologia do transtorno bipolar, como também sugerir novos alvos farmacológicos, procuramos no **Capítulo 4** melhor compreender a ação neuroprotetora do lítio e verificar a possível participação purinérgica na ações desse fármaco. Esta estratégia de estudar o mecanismo de ação do lítio se deve ao fato de mesmo este ser parcialmente conhecido (Won and Kim 2017), o lítio não somente é o tratamento de primeira escolha para o transtorno bipolar desde o século 19 como também é a melhor escolha para a profilaxia de novos episódios (Geddes and Miklowitz 2013) sendo capaz de prevenir ambos os episódios de mania e depressão (Licht 2012). Por outro lado, é importante salientar que o lítio embora seja o fármaco mais utilizado, não possui eficácia completa, sendo menos efetivo em pacientes com sintomas mistos de mania e depressão, assim como em

pacientes com ciclagem rápida (Kusumakar et al. 1997). Possui também uma série de efeitos colaterais importantes como efeitos deletérios sobre a função renal (Gitlin 1999), tireoide (Lombardi et al. 1993), metabolismo do cálcio e ganho de peso (Ng et al. 2009). Além dos efeitos colaterais existe um iminente risco de intoxicação por lítio, que deve ser cuidadosamente verificada e pacientes costumam fazer exames frequentes monitorando a níveis máximos de 1,2 mmol/L (Malhi et al. 2011). Todas essas questões muitas vezes diminuem a aderência ao tratamento, deixando clara a necessidade de fármacos adjuntos que diminuam os efeitos colaterais ou mesmo novos alvos terapêuticos que suprimam essas necessidades como um todo.

De qualquer maneira, compreender a via de ação do lítio pode abrir caminhos para a sugestão de novos alvos. Até o momento as vias sugeridas de ação são a inibição da glicogênio sintase cinase  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), efeitos sobre fatores neurotróficos, neurotransmissores, metabolismo oxidativo, apoptose, também ações sobre sistemas biológicos como ritmos circadianos e eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Stahl 2013). Ainda é sugerido modificações a nível celular, incluindo desregulação em interações glia-neurônio que poderiam explicar modificações neuroanatômicas observadas nos pacientes que fazem uso da medicação (Ongür et al. 1998).

Interessados nesta área de ação, procuramos entender a ação do lítio sobre linhagem celulares provenientes de neurônio (PC12) e microglia (N9), utilizando o ATP como modelo de insulto. De maneira geral, mostramos que células de diferentes origens neurais, tanto neuronais quanto microgliais são responsivas ao ATP, no sentido de excitotoxicidade e ativação, respectivamente. Os resultados apresentados nesse Capítulo mostraram que o lítio modulou a resposta nas células de origem neuronal PC-12 prevenindo a morte celular induzida pelo ATP. Por outro lado, nas células de origem

microglial N9 o lítio não foi capaz de prevenir a ativação via P2X7R induzida pelo ATP. Nossos achados acerca da resposta neuronal do lítio ao ATP estão de acordo com o que se tem descrito na literatura, na ação do lítio de neuroproteção, mediando mecanismos de plasticidade neural (Benedetti et al. 2011).



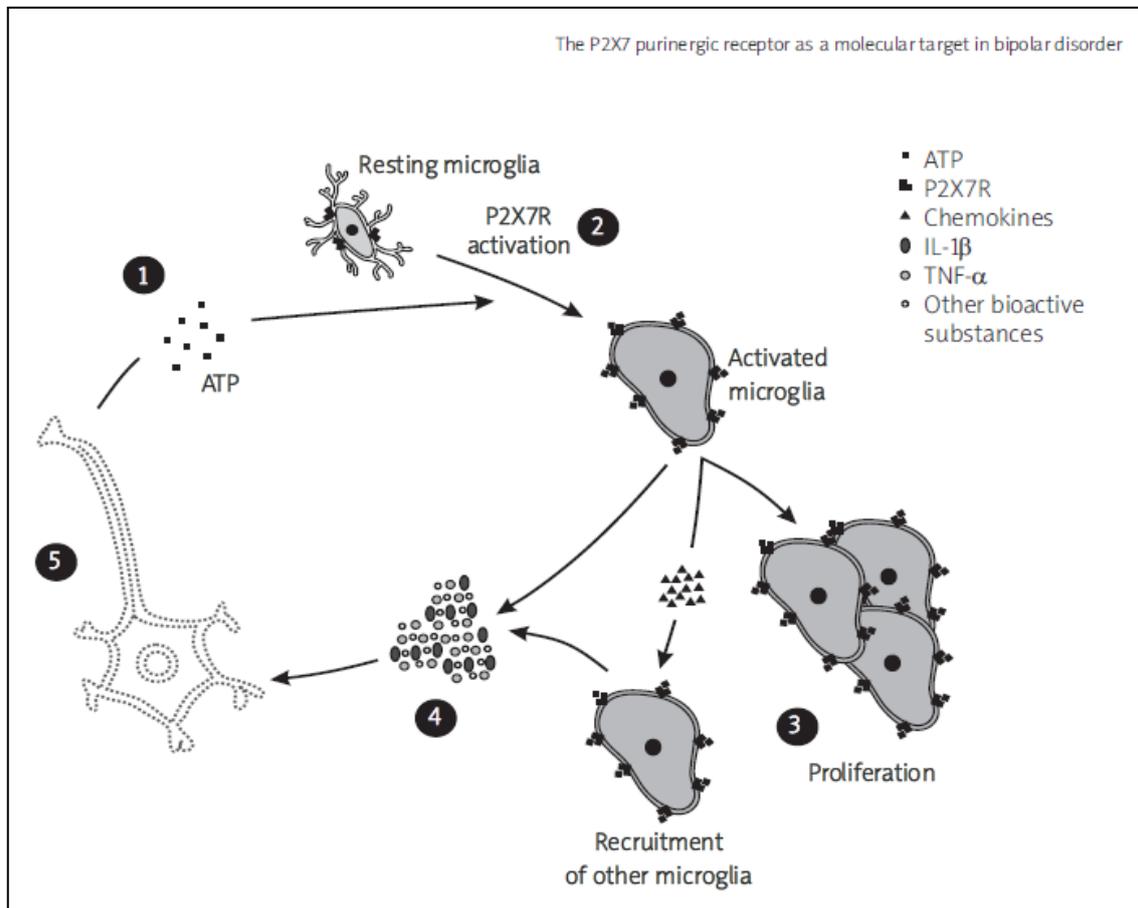
**Figura 8. Papel hipotético da inflamação e ativação microglial na fisiopatologia do TB.** Após episódios agudos, o excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias, que excedem a capacidade de reparo do sistema, mantêm a microglia em um estado constantemente ativado. A constância da presença de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no meio extracelular causa inibição da neurogênese e dano neuronal. Moléculas associadas a dano/morte neuronal ou a falha no controle de inflamação por sua vez, perpetua a toxicidade sistêmica. Da mesma maneira, a CCL11 inibe a neurogênese e as citocinas liberadas perpetuam a ativação microglial, acarretando o estabelecimento de um ciclo inflamatório (adaptado de Stertz et al. 2013).

O cérebro é rico em macrófagos residentes, identificados como células microgliais ou microglia, que são ativadas principalmente em resposta a dano tecidual e infecções cerebrais, sendo os primeiros a detectar mudanças críticas à saúde e atividade neuronal (Ferré 1997). As células microgliais participam do sistema imune, produzindo respostas predominantemente neuroprotetoras ou respostas predominantemente inflamatórias. Como já relatado anteriormente, um estudo (Rao et al. 2010) reportou importantes marcadores de neuroinflamação e excitotoxicidade em córtex pré-frontal *post-mortem* de pacientes com transtorno bipolar. O mesmo trabalho também demonstrou a ativação de uma cascata de ativação microglial, assim como aumento de marcadores de gliose (proteína glial fibrilar ácida (GFAP), iNOS, c-fos e CD11b). Por outro lado, pacientes que experimentaram um ou mais episódios maníacos/hipomaníacos recentes, demonstraram um aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$  no líquido cefalorraquidiano comparado com pacientes que não haviam tido nenhum episódio recente, o que indica uma relação entre a presença de episódios e a ativação da cascata de ativação microglial (Lucattelli et al. 2011). Os mecanismos citados acima sugerem que há ativação microglial no TB (**Figura 8**), entretanto, sabemos que o papel da ativação microglial no transtorno ainda não está completamente compreendido, sendo necessárias maiores investigações.

Por sua vez, o P2X7R tem sido descrito como um componente essencial da indução de ativação microglial (esquematizado na **Figura 9**). Como o P2X7R é ativado por concentração milimolar de ATP, ele é o receptor mais envolvido com os processos inflamatórios encefálicos (Roszek and Czarnecka 2015). O ATP extracelular, via P2X7R, atua como um mediador pró-inflamatório e de estimulação imunológica neste microambiente. A microglia, que apresenta alta expressão de P2X7R, aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 e TNF- $\alpha$ ) e

desencadeia a resposta inflamatória (Suzuki et al. 2004, Bours et al. 2006, Di Virgilio 2007) quando ativada por este purinoreceptor. Conseqüentemente, a ativação microglial leva a uma liberação de ATP pelos astrócitos, ativando purinoreceptores P2X7, P2Y1 ou P2Y2 e se inicia um quadro de astrogliose, de aumento da proliferação celular, de crescimento excessivo e de hiperplasticidade (Roszek and Czarnecka 2015). Diversos estudos têm mostrado a correlação do transtorno bipolar com a neuroinflamação e com a inflamação sistêmica (Brietzke and Kapczinski 2008, Cunha et al. 2008, Brietzke et al. 2009, Kauer-Sant'Anna et al. 2009), podendo estar atuando, também, por meio dessa via de sinalização. Neste contexto, é de suma importância investigar o envolvimento da ativação microglial no TB e esclarecer se esse envolvimento está sujeito a modulação pelo P2X7R.

Certamente mais estudos são necessários para melhor caracterizar o envolvimento do sistema purinérgico na resposta celular ao ATP e melhor investigar a ação do lítio sobre esse insulto, principalmente o envolvimento microglial. Mesmo assim, nosso trabalho sugere de maneira bastante inovadora uma resposta celular diferenciada ao lítio que pode não somente contribuir para o melhor entendimento de sua via da ação como também abrir caminhos para um novo alvo terapêutico, no caso um antagonista do P2X7R, a fim de prevenir a ativação microglial associada ao transtorno.



**Figura 9. Diagrama esquemático da relação entre a ativação do P2X7R e a ativação microglial no TB.** 1) Episódios agudos induzem dano neuronal causando a liberação de moléculas associadas a danos (DAMPs), como o ATP. 2) A liberação de ATP, em última instância, é capaz de converter as células microgliais ao redor de sua forma quiescente à sua forma ativada via ativação do P2X7R. 3) Uma vez ativada, células microgliais induzem a proliferação e o recrutamento de outras células microgliais através da liberação de quimiocinas. 4) Este *pool* de microgliais ativadas liberam citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e outras substâncias bioativas como espécies reativas de oxigênio e proteases, induzindo dano neuronal. 5) Portanto, na presença contínua de ATP, ativação microglial e o excesso de citocinas pró-inflamatórias estabelecem um ciclo de neuroinflamação e excitotoxicidade via ativação do P2X7R (adaptado de Gubert et al. 2013).

## Conclusão

Nesta tese, avaliamos metabólitos do sistema purinérgico em soro de pacientes e indivíduos controles, correlacionando com dados clínicos. Avaliamos a frequência do polimorfismo do P2X7R 1513A>C em pacientes e indivíduos controles. Realizamos um modelo animal farmacológico de mania e investigamos o envolvimento do receptor purinérgico P2X7 neste modelo e por último buscamos melhor compreender a ação neuroprotetora do lítio e verificar a participação purinérgica nesses mecanismos. Nossos resultados primeiramente nos mostraram uma diminuição nos níveis de adenosina em pacientes em comparação a controles e uma importante correlação inversa entre os níveis de adenosina e a piora dos sintomas. Demonstramos ainda que pacientes com transtorno bipolar apresentam diminuição na frequência do alelo 1513C e o potencial aumento na frequência do genótipo 1513AA e 1513AA/AC em relação aos controles configurando um pior prognóstico de aumento da forma mais ativa do receptor. Também mostramos que o P2X7R possui um papel importante no estabelecimento do modelo de mania, modulando principalmente a via dopaminérgica que é refletida na mudança comportamental observada pelo modelo e por último, mostramos que o lítio foi capaz de prevenir a resposta de insulto nas células neuronais e não foi capaz de prevenir a ativação mediada pelo P2X7R em células microgliais, indicando uma resposta celular diferenciada. Podemos concluir que de maneira translacional conseguimos demonstrar a participação do sistema purinérgico na fisiopatologia do transtorno bipolar, sugerindo ainda um possível biomarcador tanto para diagnóstico como para progressão da doença, os níveis séricos de adenosina, e ainda um potencial biomarcador genético de predição e diagnóstico da doença, o polimorfismo do P2X7R 1513A>C, assim como contribuimos para o entendimento do mecanismo de ação do lítio e definimos um potencial novo alvo terapêutico para o transtorno, o receptor P2X7.

## Perspectivas

- Caracterizar o uso de níveis séricos de adenosina como biomarcador de diagnóstico e progressão do transtorno bipolar, reproduzindo os resultados encontrados em diferentes populações, acrescentando pacientes em episódios agudos e *drug-free*.
- Confirmar a sugestão do polimorfismo do P2X7R 1513A>C como biomarcador de predição e diagnóstico do transtorno bipolar ampliando o número amostral da população. De maneira complementar, realizar análises de atividade do P2X7R em amostras de pacientes versus controles saudáveis a fim de determinar a hipótese de que pacientes com transtorno bipolar possuem a forma mais ativa do receptor P2X7R.
- Investigar diretamente a relação entre a via dopaminérgica-P2X7R-modelo pré-clínico de mania com o intuito de melhor compreender os resultados mostrados de que o bloqueio farmacológico do P2X7R gera resultados positivos e diretos sobre o comportamento.
- Avaliar se há ativação microglial induzida pelo modelo pré-clínico de mania e verificar a participação do P2X7R.
- Seguir os experimentos celulares com linhagens primárias para melhor compreender a diferenciação celular neuronal e microglial na resposta ao lítio frente a insulto e verificar o bloqueio farmacológico do P2X7R como potencial modulador adjunto ao tratamento com lítio.

## Referências

Abkevich, V., N. J. Camp, C. H. Hensel, C. D. Neff, D. L. Russell, D. C. Hughes, A. M. Plenk, M. R. Lowry, R. L. Richards, C. Carter, G. C. Frech, S. Stone, K. Rowe, C. A. Chau, K. Cortado, A. Hunt, K. Luce, G. O'Neil, J. Poarch, J. Potter, G. H. Poulsen, H. Saxton, M. Bernat-Sestak, V. Thompson, A. Gutin, M. H. Skolnick, D. Shattuck and L. Cannon-Albright (2003). "Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22-12q23.2." Am J Hum Genet **73**(6): 1271-1281.

Adinolfi, E., M. Cirillo, R. Woltersdorf, S. Falzoni, P. Chiozzi, P. Pellegatti, M. G. Callegari, D. Sandonà, F. Markwardt, G. Schmalzing and F. Di Virgilio (2010). "Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor." FASEB J **24**(9): 3393-3404.

Adinolfi, E., A. L. Giuliani, E. De Marchi, A. Pegoraro, E. Orioli and F. Di Virgilio (2017). "The P2X7 receptor: A main player in inflammation." Biochem Pharmacol.

Albert, U., D. De Cori, A. Aguglia, F. Barbaro, F. Bogetto and G. Maina (2015). "Increased uric acid levels in bipolar disorder subjects during different phases of illness." J Affect Disord **173**: 170-175.

Andreazza, A. C., B. N. Frey, B. Erdtmann, M. Salvador, F. Rombaldi, A. Santin, C. A. Gonçalves and F. Kapczinski (2007). "DNA damage in bipolar disorder." Psychiatry Res **153**(1): 27-32.

Andreazza, A. C., M. Kauer-Sant'anna, B. N. Frey, D. J. Bond, F. Kapczinski, L. T. Young and L. N. Yatham (2008). "Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis." J Affect Disord **111**(2-3): 135-144.

Angst, J. and A. Marneros (2001). "Bipolarity from ancient to modern times: conception, birth and rebirth." J Affect Disord **67**(1-3): 3-19.

Apolloni, S., C. Parisi, M. G. Pesaresi, S. Rossi, M. T. Carrì, M. Cozzolino, C. Volonté and N. D'Ambrosi (2013). "The NADPH oxidase pathway is dysregulated by the P2X7 receptor in the SOD1-G93A microglia model of amyotrophic lateral sclerosis." J Immunol **190**(10): 5187-5195.

Arts, B., N. Jabben, L. Krabbendam and J. van Os (2011). "A 2-year naturalistic study on cognitive functioning in bipolar disorder." Acta Psychiatr Scand **123**(3): 190-205.

Associação Brasileira de Psiquiatria. (2011) Revista debates em Psiquiatria. ISSN 2236-918X. 5

Baldessarini, R. J. and L. Tondo (2001). "Long-term lithium for bipolar disorder." Am J Psychiatry **158**(10): 1740.

Barden, N., M. Harvey, B. Gagné, E. Shink, M. Tremblay, C. Raymond, M. Labbé, A. Villeneuve, D. Rochette, L. Bordeleau, H. Stadler, F. Holsboer and B. Müller-Myhsok (2006). "Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **141B**(4): 374-382.

Barnett, J. H. and J. W. Smoller (2009). "The genetics of bipolar disorder." Neuroscience **164**(1): 331-343.

Barondes, S. H. (1999). "An agenda for psychiatric genetics." Arch Gen Psychiatry **56**(6): 549-552.

Bartlett, R., L. Stokes and R. Sluyter (2014). "The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease." Pharmacol Rev **66**(3): 638-675.

Bartoli, F., C. Crocamo, M. G. Mazza, M. Clerici and G. Carrà (2016). "Uric acid levels in subjects with bipolar disorder: A comparative meta-analysis." J Psychiatr Res **81**: 133-139.

Basso, A. M., N. A. Bratcher, R. R. Harris, M. F. Jarvis, M. W. Decker and L. E. Rueter (2009). "Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders." Behav Brain Res **198**(1): 83-90.

Bavaresco, C. S., F. Chiarani, J. Kolling, D. B. Ramos, G. P. Cognato, C. D. Bonan, M. R. Bogo, J. J. Sarkis, C. A. Netto and A. T. Wyse (2008). "Intrastriatal injection of hypoxanthine alters striatal ectonucleotidase activities: a time-dependent effect." Brain Res **1239**: 198-206.

Belmaker, R. H. (2004). "Bipolar disorder." N Engl J Med **351**(5): 476-486.

Benedetti, F., D. Radaelli, S. Poletti, C. Locatelli, A. Falini, C. Colombo and E. Smeraldi (2011). "Opposite effects of suicidality and lithium on gray matter volumes in bipolar depression." J Affect Disord **135**(1-3): 139-147.

Berk, M., S. Dodd, M. Kauer-Sant'anna, G. S. Malhi, M. Bourin, F. Kapczinski and T. Norman (2007). "Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder." Acta Psychiatr Scand Suppl(434): 41-49.

Berk, M., F. Kapczinski, A. C. Andreazza, O. M. Dean, F. Giorlando, M. Maes, M. Yücel, C. S. Gama, S. Dodd, B. Dean, P. V. Magalhães, P. Amminger, P. McGorry and G. S. Malhi (2011). "Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors." Neurosci Biobehav Rev **35**(3): 804-817.

Beyer, J. L. and K. R. Krishnan (2002). "Volumetric brain imaging findings in mood disorders." Bipolar Disord **4**(2): 89-104.

Bhattacharya, A., Q. Wang, H. Ao, J. R. Shoblock, B. Lord, L. Aluisio, I. Fraser, D. Nepomuceno, R. A. Neff, N. Welty, T. W. Lovenberg, P. Bonaventure, A. D. Wickenden and M. A. Letavic (2013). "Pharmacological characterization of a novel

centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567." Br J Pharmacol **170**(3): 624-640.

Bielecka, A. M. and E. Obuchowicz (2008). "Antiapoptotic action of lithium and valproate." Pharmacol Rep **60**(6): 771-782.

Bobo, W. V. (2017). "The Diagnosis and Management of Bipolar I and II Disorders: Clinical Practice Update." Mayo Clin Proc.

Bonan, C. D. (2012). "Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders." CNS Neurol Disord Drug Targets **11**(6): 739-750.

Borroto-Escuela, D. O. and K. Fuxe (2017). "Diversity and bias through dopamine D2R heteroreceptor complexes." Curr Opin Pharmacol **32**: 16-22.

Bosaipo, N. B., M. P. Foss, A. H. Young and M. F. Juruena (2017). "Neuropsychological changes in melancholic and atypical depression: A systematic review." Neurosci Biobehav Rev **73**: 309-325.

Bosaipo N. B., Borges V.F., Juruena M.F. (2017) "Bipolar disorder: a review of conceptual and clinical aspects." Medicina (Ribeirão Preto, Online.) **50**(Supl.1):72-84

Bourne, C., Ö. Aydemir, V. Balanzá-Martínez, E. Bora, S. Brissos, J. T. Cavanagh, L. Clark, Z. Cubukcuoglu, V. V. Dias, S. Dittmann, I. N. Ferrier, D. E. Fleck, S. Frangou, P. Gallagher, L. Jones, T. Kieseppä, A. Martínez-Aran, I. Melle, P. B. Moore, M. Mur, A. Pfennig, A. Raust, V. Senturk, C. Simonsen, D. J. Smith, D. S. Bio, M. G. Soeiro-de-Souza, S. D. Stoddart, K. Sundet, A. Szöke, J. M. Thompson, C. Torrent, T. Zalla, N. Craddock, O. A. Andreassen, M. Leboyer, E. Vieta, M. Bauer, P. D. Worhunsky, C. Tzagarakis, R. D. Rogers, J. R. Geddes and G. M. Goodwin (2013). "Neuropsychological testing of cognitive impairment in euthymic bipolar disorder: an individual patient data meta-analysis." Acta Psychiatr Scand **128**(3): 149-162.

Bours, M. J., E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein and P. C. Dagnelie (2006). "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." Pharmacol Ther **112**(2): 358-404.

Bradley, H. J., J. M. Baldwin, G. R. Goli, B. Johnson, J. Zou, A. Sivaprasadarao, S. A. Baldwin and L. H. Jiang (2011). "Residues 155 and 348 contribute to the determination of P2X7 receptor function via distinct mechanisms revealed by single-nucleotide polymorphisms." J Biol Chem **286**(10): 8176-8187.

Braun, N., J. Sévigny, S. K. Mishra, S. C. Robson, S. W. Barth, R. Gerstberger, K. Hammer and H. Zimmermann (2003). "Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain." Eur J Neurosci **17**(7): 1355-1364.

Braun, N., J. Sévigny, S. C. Robson, K. Enjyoji, O. Guckelberger, K. Hammer, F. Di Virgilio and H. Zimmermann (2000). "Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain." Eur J Neurosci **12**(12): 4357-4366.

Brietzke, E. and F. Kapczinski (2008). "TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **32**(6): 1355-1361.

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 **116**(3): 214-217.

Brundege, J. M. and T. V. Dunwiddie (1997). "Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system." Adv Pharmacol **39**: 353-391.

Burnstock, G. (2006). "Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling." Pharmacol Rev **58**(1): 58-86.

Burnstock, G. (2007). "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission." Physiol Rev **87**(2): 659-797.

Burnstock, G. (2017). "Purinergic Signalling: Therapeutic Developments." Front Pharmacol **8**: 661.

Burnstock, G. and G. E. Knight (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." Int Rev Cytol **240**: 31-304.

Burnstock, G., U. Krügel, M. P. Abbracchio and P. Illes (2011). "Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function." Prog Neurobiol **95**(2): 229-274.

Burnstock, G. and A. Verkhratsky (2010). "Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death." Cell Death Dis **1**: e9.

Cacilhas, A. A., P. V. Magalhães, K. M. Ceresér, J. C. Walz, F. Weyne, A. R. Rosa, E. Vieta and F. Kapczinski (2009). "Validity of a short functioning test (FAST) in Brazilian outpatients with bipolar disorder." Value Health **12**(4): 624-627.

Cardoso, T., I. E. Bauer, T. D. Meyer, F. Kapczinski and J. C. Soares (2015). "Neuroprogression and Cognitive Functioning in Bipolar Disorder: A Systematic Review." Curr Psychiatry Rep **17**(9): 75.

Caseley, E. A., S. P. Muench, S. Roger, H. J. Mao, S. A. Baldwin and L. H. Jiang (2014). "Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers." Int J Mol Sci **15**(8): 13344-13371.

Caspi, A. and T. E. Moffitt (2006). "Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience." Nat Rev Neurosci **7**(7): 583-590.

Cekic, C. and J. Linden (2016). "Purinergic regulation of the immune system." Nat Rev Immunol **16**(3): 177-192.

Chang, Y. C., H. W. Kim, S. I. Rapoport and J. S. Rao (2008). "Chronic NMDA administration increases neuroinflammatory markers in rat frontal cortex: cross-talk between excitotoxicity and neuroinflammation." Neurochem Res **33**(11): 2318-2323.

Chen, C. H., J. Suckling, B. R. Lennox, C. Ooi and E. T. Bullmore (2011). "A quantitative meta-analysis of fMRI studies in bipolar disorder." Bipolar Disord **13**(1): 1-15.

Cognato, G. P., P. M. Agostinho, J. Hockemeyer, C. E. Müller, D. O. Souza and R. A. Cunha (2010). "Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life." J Neurochem **112**(2): 453-462.

Collo, G., S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R. A. North and G. Buell (1997). "Tissue distribution of the P2X7 receptor." Neuropharmacology **36**(9): 1277-1283.

Coryell, W., C. Turvey, J. Endicott, A. C. Leon, T. Mueller, D. Solomon and M. Keller (1998). "Bipolar I affective disorder: predictors of outcome after 15 years." J Affect Disord **50**(2-3): 109-116.

Cousins, D. A., K. Butts and A. H. Young (2009). "The role of dopamine in bipolar disorder." Bipolar Disord **11**(8): 787-806.

Csölle, C., R. D. Andó, Á. Kittel, F. Gölöncsér, M. Baranyi, K. Soproni, D. Zelena, J. Haller, T. Németh, A. Mócsai and B. Sperlág (2013). "The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice." Int J Neuropsychopharmacol **16**(1): 213-233.

Cunha, A. B., A. C. Andreazza, F. A. Gomes, B. N. Frey, L. E. da Silveira, C. A. Gonçalves and F. Kapczinski (2008). "Investigation of serum high-sensitive C-reactive

protein levels across all mood states in bipolar disorder." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **258**(5): 300-304.

Cunha A.B. and Kapczinski F. (2006) "Serum BDNF is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes." Neuroscience Letters. **398**:215-9

Cunha, R. A. (2016). "How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration?" J Neurochem **139**(6): 1019-1055.

Curtis, D., G. Kalsi, J. Brynjolfsson, M. McInnis, J. O'Neill, C. Smyth, E. Moloney, P. Murphy, A. McQuillin, H. Petursson and H. Gurling (2003). "Genome scan of pedigrees multiply affected with bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-q24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q." Psychiatr Genet **13**(2): 77-84.

Daban C. and Vieta E. (2006) "Clinical correlates of first-episode polarity in bipolar disorders." Compr Psychiatry. **47**:433-7

Dawson, E., E. Parfitt, Q. Roberts, J. Daniels, L. Lim, P. Sham, M. Nöthen, P. Propping, M. Lanczik and W. Maier (1995). "Linkage studies of bipolar disorder in the region of the Darier's disease gene on chromosome 12q23-24.1." Am J Med Genet **60**(2): 94-102.

de Paula Cognato, G., A. N. Bruno, F. C. Vuaden, J. J. Sarkis and C. D. Bonan (2005). "Ontogenetic profile of ectonucleotidase activities from brain synaptosomes of pilocarpine-treated rats." Int J Dev Neurosci **23**(8): 703-709.

Deep-Soboslay, A., B. Iglesias, T. M. Hyde, L. B. Bigelow, V. Imamovic, M. M. Herman and J. E. Kleinman (2008). "Evaluation of tissue collection for postmortem studies of bipolar disorder." Bipolar Disord **10**(7): 822-828.

Degn, B., M. D. Lundorf, A. Wang, M. Vang, O. Mors, T. A. Kruse and H. Ewald (2001). "Further evidence for a bipolar risk gene on chromosome 12q24 suggested by investigation of haplotype sharing and allelic association in patients from the Faroe Islands." Mol Psychiatry **6**(4): 450-455.

Di Virgilio, F. (2007). "Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome." Trends Pharmacol Sci **28**(9): 465-472.

Di Virgilio, F., S. Ceruti, P. Bramanti and M. P. Abbracchio (2009). "Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system." Trends Neurosci **32**(2): 79-87.

Drexhage, R. C., E. M. Knijff, R. C. Padmos, L. Heul-Nieuwenhuijzen, W. Beumer, M. A. Versnel and H. A. Drexhage (2010). "The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder." Expert Rev Neurother **10**(1): 59-76.

Erhardt, A., S. Lucae, P. G. Unschuld, M. Ising, N. Kern, D. Salyakina, R. Lieb, M. Uhr, E. B. Binder, M. E. Keck, B. Müller-Myhsok and F. Holsboer (2007). "Association of polymorphisms in P2RX7 and CaMKKb with anxiety disorders." J Affect Disord **101**(1-3): 159-168.

Ewald, H., B. Degn, O. Mors and T. A. Kruse (1998). "Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24." Psychiatr Genet **8**(3): 131-140.

Fam, S. R., C. J. Gallagher and M. W. Salter (2000). "P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes." J Neurosci **20**(8): 2800-2808.

Feng, W. P., B. Zhang, W. Li and J. Liu (2014). "Lack of association of P2RX7 gene rs2230912 polymorphism with mood disorders: a meta-analysis." PLoS One **9**(2): e88575.

Fernandes, B. S., C. S. Gama, K. M. Ceresér, L. N. Yatham, G. R. Fries, G. Colpo, D. de Lucena, M. Kunz, F. A. Gomes and F. Kapczinski (2011). "Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis." J Psychiatr Res **45**(8): 995-1004.

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

Ferrari, D., M. Villalba, P. Chiozzi, S. Falzoni, P. Ricciardi-Castagnoli and F. Di Virgilio (1996). "Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP." J Immunol **156**(4): 1531-1539.

Ferré, S. (1997). "Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia." Psychopharmacology (Berl) **133**(2): 107-120.

Flaisher-Grinberg, S. and H. Einat (2010). "Strain-specific battery of tests for domains of mania: effects of valproate, lithium and imipramine." Front Psychiatry **1**: 10.

Flaisher-Grinberg, S., N. Kronfeld-Schor and H. Einat (2010). "Models of mania: from facets to domains and from animal models to model animals." J Psychopharmacol **24**(3): 437-438.

Fountoulakis, K. N. (2008). "The contemporary face of bipolar illness: complex diagnostic and therapeutic challenges." CNS Spectr **13**(9): 763-774, 777-769.

Frank, R. and R. Hargreaves (2003). "Clinical biomarkers in drug discovery and development." Nat Rev Drug Discov **2**(7): 566-580.

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

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 (2006). "Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania." J Psychiatry Neurosci **31**(5): 326-332.

Fries, G. R., S. S. Valvassori, H. Bock, L. Stertz, P. V. Magalhães, E. Mariot, R. B. Varela, M. Kauer-Sant'Anna, J. Quevedo, F. Kapczinski and M. L. Saraiva-Pereira (2015). "Memory and brain-derived neurotrophic factor after subchronic or chronic amphetamine treatment in an animal model of mania." J Psychiatr Res **68**: 329-336.

Fries, G. R., M. P. Vasconcelos-Moreno, C. Gubert, B. T. Santos, A. L. da Rosa, B. Eisele, J. Sartori, B. Pfaffenseller, F. Kapczinski and M. Kauer-Sant'anna (2014). "Early apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from patients with bipolar disorder." J Affect Disord **152-154**: 474-477.

Fuxe, K., D. Borroto-Escuela, G. Fisone, L. F. Agnati and S. Tanganelli (2014). "Understanding the role of heteroreceptor complexes in the central nervous system." Curr Protein Pept Sci **15**(7): 647.

Geddes, J. R. and D. J. Miklowitz (2013). "Treatment of bipolar disorder." Lancet **381**(9878): 1672-1682.

Gidlöf, O., J. G. Smith, O. Melander, H. Lövkvist, B. Hedblad, G. Engström, P. Nilsson, J. Carlson, G. Berglund, S. Olsson, K. Jood, C. Jern, B. Norrving, A. Lindgren and D. Erlinge (2012). "A common missense variant in the ATP receptor P2X7 is associated with reduced risk of cardiovascular events." PLoS One **7**(5): e37491.

Gitlin, M. (1999). "Lithium and the kidney: an updated review." Drug Saf **20**(3): 231-243.

Goding, J. W., B. Grobber and H. Slegers (2003). "Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family." Biochim Biophys Acta **1638**(1): 1-19.

Goodwin, F.K. and Jamison, K.R. (2007). "Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorder and Recurrent Depression." New York: Oxford University Press 2nd ed.

Goodwin GM. (2012) "Bipolar disorder". Medicine. **40**:596-8.

Goes, F. S. (2016). "Genetics of Bipolar Disorder: Recent Update and Future Directions." Psychiatr Clin North Am **39**(1): 139-155.

Goldstein, B. I., D. E. Kemp, J. K. Soczynska and R. S. McIntyre (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.

Gould, T. J., R. A. Keith and R. V. Bhat (2001). "Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine-induced open-field activity in two inbred strains of mice." Behav Brain Res **118**(1): 95-105.

Grande, I., M. Berk, B. Birmaher and E. Vieta (2016). "Bipolar disorder." Lancet **387**(10027): 1561-1572.

Green, E. K., D. Grozeva, R. Raybould, G. Elvidge, S. Macgregor, I. Craig, A. Farmer, P. McGuffin, L. Forty, L. Jones, I. Jones, M. C. O'Donovan, M. J. Owen, G. Kirov and N. Craddock (2009). "P2RX7: A bipolar and unipolar disorder candidate susceptibility gene?" Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **150B**(8): 1063-1069.

Grigoriu-Serbanescu, M., S. Herms, T. W. Mühleisen, A. Georgi, C. C. Diaconu, J. Strohmaier, P. Czerski, J. Hauser, A. Leszczynska-Rodziewicz, R. A. Jamra, G. Babadjanova, A. Tiganov, V. Krasnov, S. Kapiletti, A. I. Neagu, J. Vollmer, R. Breuer,

M. Rietschel, M. M. Nöthen, S. Cichon and P. Propping (2009). "Variation in P2RX7 candidate gene (rs2230912) is not associated with bipolar I disorder and unipolar major depression in four European samples." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **150B**(7): 1017-1021.

Gu, B. J., W. Zhang, R. A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J. A. Barden and J. S. Wiley (2001). "A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor." J Biol Chem **276**(14): 11135-11142.

Gubert C., Fries G.R., Wollenhaupt de Aguiar B., Rosa A.R., Busnello J.V., Ribeiro L., Morrone F.B., Battastini A.M.O. and Kapczinski F. (2013) "The P2X7 purinergic receptor as a molecular target in bipolar disorder". Neuropsychiatria i Neuropsychologia. **8**, 1: 1–7

Gubert, C., G. R. Fries, B. Pfaffenseller, P. Ferrari, R. Coutinho-Silva, F. B. Morrone, F. Kapczinski and A. M. Battastini (2016). "Role of P2X7 Receptor in an Animal Model of Mania Induced by D-Amphetamine." Mol Neurobiol **53**(1): 611-620.

Hajek, T., N. Carrey and M. Alda (2005). "Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder." Bipolar Disord **7**(5): 393-403.

Hannah-Poquette, C., G. W. Anderson, S. Flaisher-Grinberg, J. Wang, T. M. Meinerding and H. Einat (2011). "Modeling mania: Further validation for Black Swiss mice as model animals." Behav Brain Res **223**(1): 222-226.

Hashimoto, K., A. Sawa and M. Iyo (2007). "Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders." Biol Psychiatry **62**(11): 1310-1316.

Hejjas, K., A. Szekely, E. Domotor, Z. Halmi, G. Balogh, B. Schilling, A. Sarosi, G. Faludi, M. Sasvari-Szekely and Z. Némóda (2009). "Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: a dimensional approach." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **150B**(2): 295-299.

Horvat, A., I. Stanojević, D. Drakulić, N. Velicković, S. Petrović and M. Milosević (2010). "Effect of acute stress on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in brain synaptosomes in different stages of development." Int J Dev Neurosci **28**(2): 175-182.

Huang, J., X. Gao, S. Li and Z. Cao (1997). "Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 12829-12832.

Huxley, N. and R. J. Baldessarini (2007). "Disability and its treatment in bipolar disorder patients." Bipolar Disord **9**(1-2): 183-196.

Jamison K. R. (1996) "Uma mente inquieta: memórias de loucura e instabilidade de humor." São Paulo: Martins Fontes. 267p.

Johnson, S. L., A. K. Cuellar, A. K. Cueller, C. Ruggero, C. Winett-Perlman, P. Goodnick, R. White and I. Miller (2008). "Life events as predictors of mania and depression in bipolar I disorder." J Abnorm Psychol **117**(2): 268-277.

Joyce, P. R., D. M. Fergusson, G. Woollard, R. M. Abbott, L. J. Horwood and J. Upton (1995). "Urinary catecholamines and plasma hormones predict mood state in rapid cycling bipolar affective disorder." J Affect Disord **33**(4): 233-243.

Kapczinski, F., P. V. Magalhães, V. Balanzá-Martinez, V. V. Dias, S. Frangou, C. S. Gama, A. Gonzalez-Pinto, I. Grande, K. Ha, M. Kauer-Sant'Anna, M. Kunz, R. Kupka, M. Leboyer, C. Lopez-Jaramillo, R. M. Post, J. K. Rybakowski, J. Scott, S. Strejilevitch, M. Tohen, G. Vazquez, L. Yatham, E. Vieta and M. Berk (2014). "Staging systems in bipolar disorder: an International Society for Bipolar Disorders Task Force Report." Acta Psychiatr Scand **130**(5): 354-363.

Kapczinski, F. and L. G. Streb (2014). "Neuroprogression and staging in psychiatry: historical considerations." Rev Bras Psiquiatr **36**(3): 187-188.

Kapczinski, F., E. Vieta, A. C. Andreazza, B. N. Frey, F. A. Gomes, J. Tramontina, M. Kauer-Sant'anna, R. Grassi-Oliveira and R. M. Post (2008). "Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment." Neurosci Biobehav Rev **32**(4): 675-692.

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 **12**(4): 447-458.

Kessler, R. C., P. R. Barker, L. J. Colpe, J. F. Epstein, J. C. Gfroerer, E. Hiripi, M. J. Howes, S. L. Normand, R. W. Manderscheid, E. E. Walters and A. M. Zaslavsky (2003). "Screening for serious mental illness in the general population." Arch Gen Psychiatry **60**(2): 184-189.

Kim, Y. K., H. G. Jung, A. M. Myint, H. Kim and S. H. Park (2007). "Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder." J Affect Disord **104**(1-3): 91-95.

Kim, Y. K., H. G. Jung, A. M. Myint, H. Kim and S. H. Park (2007). "Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder." J Affect Disord **104**(1-3): 91-95.

Kittner, H., H. Franke, W. Fischer, N. Schultheis, U. Krügel and P. Illes (2003). "Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production." Neuropsychopharmacology **28**(3): 435-444.

Kovács, Z., A. Dobolyi, K. A. Kékesi and G. Juhász (2013). "5'-nucleotidases, nucleosides and their distribution in the brain: pathological and therapeutic implications." Curr Med Chem **20**(34): 4217-4240.

Kukulski, F., S. A. Lévesque, E. G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, A. F. Knowles, S. C. Robson, T. L. Kirley and J. Sévigny (2005). "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8." Purinergic Signal **1**(2): 193-204.

Kukulski, F., J. Sévigny and M. Komoszyński (2004). "Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata." Brain Res **1030**(1): 49-56.

Kulkarni, S., S. Jain, Y. C. Janardhan Reddy, K. J. Kumar and T. Kandavel (2010). "Impairment of verbal learning and memory and executive function in unaffected siblings of probands with bipolar disorder." Bipolar Disord **12**(6): 647-656.

Kupfer, D. J. (2005). "The increasing medical burden in bipolar disorder." JAMA **293**(20): 2528-2530.

Kusumakar, V., L. N. Yatham, D. R. Haslam, S. V. Parikh, R. Matte, P. H. Silverstone and V. Sharma (1997). "Treatment of mania, mixed state, and rapid cycling." Can J Psychiatry **42 Suppl 2**: 79S-86S.

Lara, D. R. and D. O. Souza (2000). "Schizophrenia: a purinergic hypothesis." Med Hypotheses **54**(2): 157-166.

Lazarowski, E. R., R. C. Boucher and T. K. Harden (2000). "Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations." J Biol Chem **275**(40): 31061-31068.

Lemmens, R., L. Vanduffel, H. Teuchy and O. Culic (1996). "Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes." Biochem J **316 ( Pt 2)**: 551-557.

Lenertz, L. Y., M. L. Gavala, Y. Zhu and P. J. Bertics (2011). "Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions." Immunol Res **50**(1): 22-38.

Li, C. R., G. B. Huang, Z. Y. Sui, E. H. Han and Y. C. Chung (2010). "Effects of 6-hydroxydopamine lesioning of the medial prefrontal cortex on social interactions in adolescent and adult rats." Brain Res **1346**: 183-189.

Licht, R. W. (2012). "Lithium: still a major option in the management of bipolar disorder." CNS Neurosci Ther **18**(3): 219-226.

Lichtenstein, P., B. H. Yip, C. Björk, Y. Pawitan, T. D. Cannon, P. F. Sullivan and C. M. Hultman (2009). "Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study." Lancet **373**(9659): 234-239.

Logan, R. W. and C. A. McClung (2016). "Animal models of bipolar mania: The past, present and future." Neuroscience **321**: 163-188.

Lombardi, G., N. Panza, B. Biondi, L. Di Lorenzo, G. Lupoli, G. Muscettola, C. Carella and A. Bellastella (1993). "Effects of lithium treatment on hypothalamic-pituitary-thyroid axis: a longitudinal study." J Endocrinol Invest **16**(4): 259-263.

Luca-Noronha D. Limites da Fenomenologia da Empatia na Cognição Social. (2015). Eutomia: revista de literatura e linguística. 15 (1): 177-198

Lucae, S., D. Salyakina, N. Barden, M. Harvey, B. Gagné, M. Labbé, E. B. Binder, M. Uhr, M. Paez-Pereda, I. Sillaber, M. Ising, T. Brückl, R. Lieb, F. Holsboer and B. Müller-Myhsok (2006). "P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder." Hum Mol Genet **15**(16): 2438-2445.

Lucattelli, M., S. Cicko, T. Müller, M. Lommatzsch, G. De Cunto, S. Cardini, W. Sundas, M. Grimm, R. Zeiser, T. Dürk, G. Zissel, S. Sorichter, D. Ferrari, F. Di

Virgilio, J. C. Virchow, G. Lungarella and M. Idzko (2011). "P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema." Am J Respir Cell Mol Biol **44**(3): 423-429.

Machado-Vieira, R. (2012). "Purinergic system in the treatment of bipolar disorder: uric acid levels as a screening test in mania." J Clin Psychopharmacol **32**(5): 735-736.

Machado-Vieira, R., D. R. Lara, D. O. Souza and F. Kapczinski (2002). "Purinergic dysfunction in mania: an integrative model." Med Hypotheses **58**(4): 297-304.

Macêdo, D. S., C. D. Medeiros, R. C. Cordeiro, F. C. Sousa, J. V. Santos, T. A. Morais, T. N. Hyphantis, R. S. McIntyre, J. Quevedo and A. F. Carvalho (2012). "Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by D-amphetamine." Bipolar Disord **14**(7): 707-718.

Maes, M., E. Bosmans, J. Calabrese, R. Smith and H. Y. Meltzer (1995). "Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers." J Psychiatr Res **29**(2): 141-152.

Malhi, G. S., M. Tanius and S. Gershon (2011). "The lithiumeter: a measured approach." Bipolar Disord **13**(3): 219-226.

Marcoli, M., C. Cervetto, P. Paluzzi, S. Guarnieri, S. Alloisio, S. Thellung, M. Nobile and G. Maura (2008). "P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release." J Neurochem **105**(6): 2330-2342.

Martinez-Aran, A., E. Vieta, C. Torrent, J. Sanchez-Moreno, J. M. Goikolea, M. Salamero, G. S. Malhi, A. Gonzalez-Pinto, C. Daban, S. Alvarez-Grandi, K. Fountoulakis, G. Kaprinis, R. Tabares-Seisdedos and J. L. Ayuso-Mateos (2007). "Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors." Bipolar Disord **9**(1-2): 103-113.

Martínez-Arán, A., E. Vieta, M. Reinares, F. Colom, C. Torrent, J. Sánchez-Moreno, A. Benabarre, J. M. Goikolea, M. Comes and M. Salamero (2004). "Cognitive function across manic or hypomanic, depressed, and euthymic states in bipolar disorder." Am J Psychiatry **161**(2): 262-270.

Maziade, M., M. A. Roy, E. Rouillard, L. Bissonnette, J. P. Fournier, A. Roy, Y. Garneau, N. Montgrain, A. Potvin, D. Cliche, C. Dion, H. Wallot, A. Fournier, L. Nicole, J. C. Lavallée and C. Mérette (2001). "A search for specific and common susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a linkage study in 13 target chromosomes." Mol Psychiatry **6**(6): 684-693.

McGuffin, P., J. Knight, G. Breen, S. Brewster, P. R. Boyd, N. Craddock, M. Gill, A. Korszun, W. Maier, L. Middleton, O. Mors, M. J. Owen, J. Perry, M. Preisig, T. Reich, J. Rice, M. Rietschel, L. Jones, P. Sham and A. E. Farmer (2005). "Whole genome linkage scan of recurrent depressive disorder from the depression network study." Hum Mol Genet **14**(22): 3337-3345.

McQuillin, A., N. J. Bass, K. Choudhury, V. Puri, M. Kosmin, J. Lawrence, D. Curtis and H. M. Gurling (2009). "Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders." Mol Psychiatry **14**(6): 614-620.

Merikangas, K. R., H. S. Akiskal, J. Angst, P. E. Greenberg, R. M. Hirschfeld, M. Petukhova and R. C. Kessler (2007). "Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication." Arch Gen Psychiatry **64**(5): 543-552.

Meyendorff, E., B. Lerer, N. C. Moore, J. Bow and S. Gershon (1985). "Methylphenidate infusion in euthymic bipolars: effect of carbamazepine pretreatment." Psychiatry Res **16**(4): 303-308.

Miller, C. M., N. R. Boulter, S. J. Fuller, A. M. Zakrzewski, M. P. Lees, B. M. Saunders, J. S. Wiley and N. C. Smith (2011). "The role of the P2X<sub>7</sub> receptor in infectious diseases." PLoS Pathog **7**(11): e1002212.

Minassian, A., J. W. Young, Z. A. Cope, B. L. Henry, M. A. Geyer and W. Perry (2016). "Amphetamine increases activity but not exploration in humans and mice." Psychopharmacology (Berl) **233**(2): 225-233.

Mondimore, F. M. (2005). "Kraepelin and manic-depressive insanity: an historical perspective." Int Rev Psychiatry **17**(1): 49-52.

Morissette, J., A. Villeneuve, L. Bordeleau, D. Rochette, C. Laberge, B. Gagné, C. Laprise, G. Bouchard, M. Plante, L. Gobeil, E. Shink, J. Weissenbach and N. Barden (1999). "Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in a very large pedigree derived from a homogeneous population in quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23-q24." Am J Med Genet **88**(5): 567-587.

Mueller, H. T. and J. H. Meador-Woodruff (2004). "NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder." Schizophr Res **71**(2-3): 361-370.

Mundo, E., S. Tharmalingham, M. Neves-Pereira, E. J. Dalton, F. Macciardi, S. V. Parikh, A. Bolonna, R. W. Kerwin, M. J. Arranz, A. J. Makoff and J. L. Kennedy (2003). "Evidence that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1) confers susceptibility to bipolar disorder." Mol Psychiatry **8**(2): 241-245.

Munkholm, K., M. Vinberg and L. Vedel Kessing (2013). "Cytokines in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis." J Affect Disord **144**(1-2): 16-27.

Muñoz-Planillo, R., P. Kuffa, G. Martínez-Colón, B. L. Smith, T. M. Rajendiran and G. Núñez (2013). "K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter." Immunity **38**(6): 1142-1153.

Ng, F., O. K. Mammen, I. Wilting, G. S. Sachs, I. N. Ferrier, F. Cassidy, S. Beaulieu, L. N. Yatham, M. Berk and I. S. f. B. Disorders (2009). "The International Society for Bipolar Disorders (ISBD) consensus guidelines for the safety monitoring of bipolar disorder treatments." Bipolar Disord **11**(6): 559-595.

Nieber, K., D. Eschke and A. Brand (1999). "Brain hypoxia: effects of ATP and adenosine." Prog Brain Res **120**: 287-297.

Nivoli, A. M., A. Murru, J. M. Goikolea, J. M. Crespo, J. M. Montes, A. González-Pinto, P. García-Portilla, J. Bobes, J. Sáiz-Ruiz and E. Vieta (2012). "New treatment guidelines for acute bipolar mania: a critical review." J Affect Disord **140**(2): 125-141.

North, R. A. (2016). "P2X receptors." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **371**(1700).

Ohlendorff, S. D., C. L. Tofteng, J. E. Jensen, S. Petersen, R. Civitelli, M. Fenger, B. Abrahamsen, A. P. Hermann, P. Eiken, N. R. Jørgensen and N. R. Jrgensen (2007). "Single nucleotide polymorphisms in the P2X7 gene are associated to fracture risk and to effect of estrogen treatment." Pharmacogenet Genomics **17**(7): 555-567.

Ongür, D., W. C. Drevets and J. L. Price (1998). "Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13290-13295.

Ortiz, R., H. Ulrich, C. A. Zarate and R. Machado-Vieira (2015). "Purinergic system dysfunction in mood disorders: a key target for developing improved therapeutics." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **57**: 117-131.

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 **9**(6): 596-602.

Pacher, P., A. Nivorozhkin and C. Szabó (2006). "Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol." Pharmacol Rev **58**(1): 87-114.

Pattanayak, R. D., R. Sagar and M. Mehta (2012). "Neuropsychological performance in euthymic Indian patients with bipolar disorder type I: correlation between quality of life and global functioning." Psychiatry Clin Neurosci **66**(7): 553-563.

Pfaffenseller, B., B. Wollenhaupt-Aguiar, G. R. Fries, G. D. Colpo, R. K. Burque, G. Bristot, P. Ferrari, K. M. Ceresér, A. R. Rosa, F. Klamt and F. Kapczinski (2014). "Impaired endoplasmic reticulum stress response in bipolar disorder: cellular evidence of illness progression." Int J Neuropsychopharmacol **17**(9): 1453-1463.

Phillips, M. L. and D. J. Kupfer (2013). "Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions." Lancet **381**(9878): 1663-1671.

Pichot, P. (2004). "[Circular insanity, 150 years on]." Bull Acad Natl Med **188**(2): 275-284.

Post, R. M. (2007). "Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena." Neurosci Biobehav Rev **31**(6): 858-873.

Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-492.

Rao, J. S., R. N. Ertley, S. I. Rapoport, R. P. Bazinet and H. J. Lee (2007). "Chronic NMDA administration to rats up-regulates frontal cortex cytosolic phospholipase A2 and its transcription factor, activator protein-2." J Neurochem **102**(6): 1918-1927.

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 **15**(4): 384-392.

Resta, R., Y. Yamashita and L. F. Thompson (1998). "Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73." Immunol Rev **161**: 95-109.

Ribeiro, J. A., A. M. Sebastiao and A. de Mendonca (2003). "Participation of adenosine receptors in neuroprotection." Drug News Perspect **16**(2): 80-86.

Robinson, L. J., J. M. Thompson, P. Gallagher, U. Goswami, A. H. Young, I. N. Ferrier and P. B. Moore (2006). "A meta-analysis of cognitive deficits in euthymic patients with bipolar disorder." J Affect Disord **93**(1-3): 105-115.

Robson, S. C., J. Sévigny and H. Zimmermann (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." Purinergic Signal **2**(2): 409-430.

Roger, S., Z. Z. Mei, J. M. Baldwin, L. Dong, H. Bradley, S. A. Baldwin, A. Surprenant and L. H. Jiang (2010). "Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions." J Psychiatr Res **44**(6): 347-355.

Rosa, A. R., M. Reinares, C. Franco, M. Comes, C. Torrent, J. Sánchez-Moreno, A. Martínez-Arán, M. Salamero, F. Kapczinski and E. Vieta (2009). "Clinical predictors of functional outcome of bipolar patients in remission." Bipolar Disord **11**(4): 401-409.

Rosa, A. R., M. Reinares, E. E. Michalak, C. M. Bonnin, B. Sole, C. Franco, M. Comes, C. Torrent, F. Kapczinski and E. Vieta (2010). "Functional impairment and disability across mood states in bipolar disorder." Value Health **13**(8): 984-988.

Rosa, A. R., J. Sánchez-Moreno, A. Martínez-Arán, M. Salamero, C. Torrent, M. Reinares, M. Comes, F. Colom, W. Van Riel, J. L. Ayuso-Mateos, F. Kapczinski and E. Vieta (2007). "Validity and reliability of the Functioning Assessment Short Test (FAST) in bipolar disorder." Clin Pract Epidemiol Ment Health **3**: 5.

Rosenblat, J. D., D. S. Cha, R. B. Mansur and R. S. McIntyre (2014). "Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

Roszek, K. and J. Czarnecka (2015). "Is Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase)-based Therapy of Central Nervous System Disorders Possible?" Mini Rev Med Chem **15**(1): 5-20.

Sagar, R. and R. D. Pattanayak (2017). "Potential biomarkers for bipolar disorder: Where do we stand?" Indian J Med Res **145**(1): 7-16.

Sanz, J. M. and F. Di Virgilio (2000). "Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells." J Immunol **164**(9): 4893-4898.

Sanz, J. M., S. Falzoni, R. Rizzo, F. Cipollone, G. Zuliani and F. Di Virgilio (2014). "Possible protective role of the 489C>T P2X7R polymorphism in Alzheimer's disease." Exp Gerontol **60**: 117-119.

Sassi, R. B., M. Nicoletti, P. Brambilla, A. G. Mallinger, E. Frank, D. J. Kupfer, M. S. Keshavan and J. C. Soares (2002). "Increased gray matter volume in lithium-treated bipolar disorder patients." Neurosci Lett **329**(2): 243-245.

Scola, G. and A. C. Andreazza (2014). "Current state of biomarkers in bipolar disorder." Curr Psychiatry Rep **16**(12): 514.

Scotti, M. A., G. Lee, S. A. Stevenson, A. M. Ostromecki, T. J. Wied, D. J. Kula, G. M. Gessay and S. C. Gammie (2011). "Behavioral and pharmacological assessment of a potential new mouse model for mania." Physiol Behav **103**(3-4): 376-383.

Sharma, A. N., G. R. Fries, J. F. Galvez, S. S. Valvassori, J. C. Soares, A. F. Carvalho and J. Quevedo (2016). "Modeling mania in preclinical settings: A comprehensive review." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **66**: 22-34.

Shink, E., J. Morissette, R. Sherrington and N. Barden (2005). "A genome-wide scan points to a susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 12." Mol Psychiatry **10**(6): 545-552.

Sim, J. A., M. T. Young, H. Y. Sung, R. A. North and A. Surprenant (2004). "Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain." J Neurosci **24**(28): 6307-6314.

Skaper, S. D., P. Debetto and P. Giusti (2009). "P2X(7) Receptors in Neurological and Cardiovascular Disorders." Cardiovasc Psychiatry Neurol **2009**: 861324.

Skaper, S. D., P. Debetto and P. Giusti (2010). "The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders." FASEB J **24**(2): 337-345.

Sluyter, R. (2017). "The P2X7 Receptor." Adv Exp Med Biol **1051**: 17-53.

Somers, J. M., E. M. Goldner, P. Waraich and L. Hsu (2006). "Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature." Can J Psychiatry **51**(2): 100-113.

Sperlágh, B. and P. Illes (2014). "P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases." Trends Pharmacol Sci **35**(10): 537-547.

Stahl, S. M. (2013). "Classifying psychotropic drugs by mode of action and not by target disorder." CNS Spectr **18**(3): 113-117.

Stanojević, I., I. Bjelobaba, N. Nedeljković, D. Drakulić, S. Petrović, M. Stojiljković and A. Horvat (2011). "Ontogenetic profile of ecto-5'-nucleotidase in rat brain synaptic plasma membranes." Int J Dev Neurosci **29**(4): 397-403.

Stertz, L., G. R. Fries, A. R. Rosa, M. Kauer-Sant'anna, P. Ferrari, A. V. Paz, C. Green, Â. Cunha, F. Dal-Pizzol, C. Gottfried and F. Kapczinski (2015). "Damage-associated molecular patterns and immune activation in bipolar disorder." Acta Psychiatr Scand **132**(3): 211-217.

Stertz, L., P. V. Magalhães and F. Kapczinski (2013). "Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation." Curr Opin Psychiatry **26**(1): 19-26.

Strakowski, S. M., M. P. DelBello, M. E. Zimmerman, G. E. Getz, N. P. Mills, J. Ret, P. Shear and C. M. Adler (2002). "Ventricular and periventricular structural volumes in first- versus multiple-episode bipolar disorder." Am J Psychiatry **159**(11): 1841-1847.

Sun, S. H. (2010). "Roles of P2X7 receptor in glial and neuroblastoma cells: the therapeutic potential of P2X7 receptor antagonists." Mol Neurobiol **41**(2-3): 351-355.

Surprenant, A. and R. A. North (2009). "Signaling at purinergic P2X receptors." Annu Rev Physiol **71**: 333-359.

Suzuki, T., I. Hide, K. Ido, S. Kohsaka, K. Inoue and Y. Nakata (2004). "Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia." J Neurosci **24**(1): 1-7.

Takenouchi, T., M. Nakai, Y. Iwamaru, S. Sugama, M. Tsukimoto, M. Fujita, J. Wei, A. Sekigawa, M. Sato, S. Kojima, H. Kitani and M. Hashimoto (2009). "The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells." J Immunol **182**(4): 2051-2062.

Tohen M., Vieta E., Calabrese J. (2003) "Efficacy of olanzapine and olanzapine fluoxetine combination in the treatment of bipolar I depression." Arch Gen Psychiatry **60**: 1079-1088.

Valvassori, S. S., G. T. Rezin, C. L. Ferreira, M. Moretti, C. L. Gonçalves, M. R. Cardoso, E. L. Streck, F. Kapczinski and J. Quevedo (2010). "Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine." J Psychiatr Res **44**(14): 903-909.

Verkhratsky, A., A. Verkhrasky, O. A. Krishtal and G. Burnstock (2009). "Purinoceptors on neuroglia." Mol Neurobiol **39**(3): 190-208.

Vieta, E., O. Günther, J. Locklear, M. Ekman, C. Miltenburger, M. L. Chatterton, M. Åström and B. Paulsson (2011). "Effectiveness of psychotropic medications in the maintenance phase of bipolar disorder: a meta-analysis of randomized controlled trials." Int J Neuropsychopharmacol **14**(8): 1029-1049.

Vieta, E., M. Reinares and A. R. Rosa (2011). "Staging bipolar disorder." Neurotox Res **19**(2): 279-285.

Vollmayer, P., T. Clair, J. W. Goding, K. Sano, J. Servos and H. Zimmermann (2003). "Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases." Eur J Biochem **270**(14): 2971-2978.

Vorhoff, T., H. Zimmermann, J. Pelletier, J. Sévigny and N. Braun (2005). "Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin." Purinergic Signal **1**(3): 259-270.

Walz, J. C., B. N. Frey, A. C. Andreazza, K. M. Ceresér, A. A. Cacilhas, S. S. Valvassori, J. Quevedo and F. Kapczinski (2008). "Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania." J Psychiatr Res **42**(5): 416-421.

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

Weiser, M., S. Burshtein, A. A. Gershon, G. Marian, N. Vlad, I. G. Grecu, E. Tocari, A. Tiugan, M. Hotineanu and J. M. Davis (2014). "Allopurinol for mania: a randomized trial of allopurinol versus placebo as add-on treatment to mood stabilizers and/or antipsychotic agents in manic patients with bipolar disorder." Bipolar Disord **16**(4): 441-447.

Wesselius, A., M. J. Bours, I. C. Arts, E. H. Theunisz, P. Geusens and P. C. Dagnelie (2012). "The P2X(7) loss-of-function Glu496Ala polymorphism affects ex vivo cytokine release and protects against the cytotoxic effects of high ATP-levels." BMC Immunol **13**: 64.

White, N. and G. Burnstock (2006). "P2 receptors and cancer." Trends Pharmacol Sci **27**(4): 211-217.

Wiley, J. S., L. P. Dao-Ung, B. J. Gu, R. Sluyter, A. N. Shemon, C. Li, J. Taper, J. Gallo and A. Manoharan (2002). "A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study." Lancet **359**(9312): 1114-1119.

Wilot, L. C., A. Bernardi, R. L. Frozza, A. L. Marques, H. Cimarosti, C. Salbego, E. Rocha and A. M. Battastini (2007). "Lithium and valproate protect hippocampal slices against ATP-induced cell death." Neurochem Res **32**(9): 1539-1546.

Wingo, A. P., P. D. Harvey and R. J. Baldessarini (2009). "Neurocognitive impairment in bipolar disorder patients: functional implications." Bipolar Disord **11**(2): 113-125.

Won, E. and Y. K. Kim (2017). "An Oldie but Goodie: Lithium in the Treatment of Bipolar Disorder through Neuroprotective and Neurotrophic Mechanisms." Int J Mol Sci **18**(12).

Wu, G., M. Zhao, X. Gu, Y. Yao, H. Liu and Y. Song (2014). "The effect of P2X7 receptor 1513 polymorphism on susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis." Infect Genet Evol **24**: 82-91.

Wurm, A., S. Lipp, T. Pannicke, R. Linnertz, U. Krügel, A. Schulz, K. Färber, D. Zahn, J. Grosse, P. Wiedemann, J. Chen, T. Schöneberg, P. Illes, A. Reichenbach and A. Bringmann (2010). "Endogenous purinergic signaling is required for osmotic volume regulation of retinal glial cells." J Neurochem **112**(5): 1261-1272.

Yates, J. W., J. T. Meij, J. R. Sullivan, N. M. Richtand and L. Yu (2007). "Bimodal effect of amphetamine on motor behaviors in C57BL/6 mice." Neurosci Lett **427**(1): 66-70.

Yatham, L. N., I. K. Lyoo, P. Liddle, P. F. Renshaw, D. Wan, R. W. Lam and J. Hwang (2007). "A magnetic resonance imaging study of mood stabilizer- and neuroleptic-naïve first-episode mania." Bipolar Disord **9**(7): 693-697.

Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-694.

Yegutkin, G. G. (2014). "Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities." Crit Rev Biochem Mol Biol **49**(6): 473-497.

Yutzy, S. H., C. R. Woofter, C. C. Abbott, I. M. Melhem and B. S. Parish (2012). "The increasing frequency of mania and bipolar disorder: causes and potential negative impacts." J Nerv Ment Dis **200**(5): 380-387.

Zarate, C. A., M. Tohen, M. Land and S. Cavanagh (2000). "Functional impairment and cognition in bipolar disorder." Psychiatr Q **71**(4): 309-329.

Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.

Zimmermann, H. (2006). "Ectonucleotidases in the nervous system." Novartis Found Symp **276**: 113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181.

Zimmermann, H., M. Zebisch and N. Sträter (2012). "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases." Purinergic Signal **8**(3): 437-502.

Zubenko, G. S., B. Maher, H. B. Hughes, W. N. Zubenko, J. S. Stiffler, B. B. Kaplan and M. L. Marazita (2003). "Genome-wide linkage survey for genetic loci that influence the development of depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **123B**(1): 1-18.

## Anexo I

### Artigos científicos publicados em co-autoria durante o período do doutorado.

1. Parcianello RR, Mardini V, Ceresér KMM, Langleben DD, Xavier F, Zavaschi MLS, Rhode LAP, Pechansky F, **Gubert C**, Szobot CM. Increased cocaine and amphetamine-regulated transcript cord blood levels in the newborns exposed to crack cocaine in utero. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018 Jan;235(1):215-222.
2. Vasconcelos-Moreno, M.P., Fries G.R., **Gubert, C.**, Santos B.T.M.Q., Fijtman, A., Sartori, J., Ferrari, P., Grun, L.K., Parisi, M.M., Guma, F.T.C.R., Barbé-Tuana, F.M., Kapczinski, F., Rosa, A.R., Yatham, L.N. & Kauer-Sant'Anna, M. (2017) Telomere length, oxidative stress, inflammation and BDNF levels in siblings of patients with bipolar disorder: implications for accelerated cellular aging. *Int. J. Neuropsychopharmacol*. 20: 445-454.
3. Mardini, V., Rohde, L.A., Ceresér, K.M., **Gubert, C.M.**, Silva, E.G.D., Xavier, F., Parcianello, R., Röhsig, L.M., Pechansky, F. & Szobot, C.M. (2017) TBARS and BDNF changes in newborns exposed to crack/cocaine during pregnancy - a comparative study. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 3: 263-266.
4. Mardini, V., Rohde, L.A., Ceresér, K.M., **Gubert, C. de M.**, Silva, E.G., Xavier, F., Parcianello, R., Röhsig, L.M., Pechansky, F., Pianca, T.G. & Szobot, C.M. (2016) IL-6 and IL-10 levels in the umbilical cord blood of newborns with a history of crack/cocaine exposure in utero: a comparative study. *Trends. Psychiatry. Psychother*. 38: 40-49.
5. Panizzutti, B., **Gubert, C.**, Schuh, A.L., Ferrari, P., Bristot, G., Fries, G.R., Massuda, R., Walz, J., Rocha, N.P., Berk, M., Teixeira, A.L. & Gama, C.S. (2015) Increased serum levels of eotaxin/CCL11 in late-stage patients with bipolar disorder: An accelerated aging biomarker? *J. Affect. Disord*. 182: 64-69.
6. Passos, J.A.F., Pires, A.V., Scheidt, I., Almeida, I.A., Ferreira, C.F., **Gubert, C.**, Bizarro, I. & Almeida, R.M.M. (2015) Alcohol use in adolescence, impulsivity, and risk-taking behavior in wistar rats. *Psych. & Neurosc*. 8: 130-142.
7. Steckert, A.V., Comim, C.M., Igna, D.M., Domingui, D., Mendonça, B.P., Ornell, F., Colpo, G.D., **Gubert, C.**, Kapczinski, F., Barichello, T., Quevedo, J. & Dal-Pizzol, F. (2015) Effects of sodium butyrate on aversive memory in rats submitted to sepsis. *Neurosci. Lett*. 595: 134-138.
8. Barichello, T., Generoso, J.S., Simões, L.R., Steckert, A.V., Moreira, A.P., Domingui, D., Ferrari, P., **Gubert, C.**, Kapczinski, F., Jornada, L.K., Danielski, L.G., Petronilho, F., Budni, J. & Quevedo, J. (2014) Folic acid prevented cognitive impairment in experimental pneumococcal meningitis. *J. Neural. Transm*. 122: 643-51.

9. Fries, G.R., Vasconcelos-Moreno, M.P., **Gubert, C.**, dos Santos, B.T., Sartori, J., Eisele, B., Ferrari, P., Fijtman, A., Rüegg, J., Gassen, N.C., Kapczinski, F., Rein, T. & Kauer-Sant'Anna, M. (2014) Hypothalamic pituitary-adrenal axis dysfunction and illness progression in bipolar disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18: 1-10.
10. Sordi, A.O., Pechansky, F., Kessler, F.H., Kapczinski, F., Pfaffenseller, B., **Gubert, C.**, de Aguiar, B.W., de Magalhães Narvaez, J.C., Ornell, F. & von Diemen, L. (2014) Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. *Psychopharmacology.* 231: 4031-4039.
11. Barichello, T., Generoso, J.S., Simões, L.R., Ceretta, R.A., Dinguini, D., Ferrari, P., **Gubert, C.**, Jornada, L.K., Budni, J., Kapczinski, F. & Quevedo, J. (2014) Vitamin B6 prevents cognitive impairment in experimental pneumococcal meningitis. *Exp. Biol. Med.* 239: 1360-1365.
12. Stertz, L., Fries, G.R., Aguiar, B.W., Pfaffenseller, B., Valvassori, S.S., **Gubert, C.**, Ferreira, C.L., Moretti, M., Ceresér, K.M., Kauer-Sant'Anna, M. (2014) Histone deacetylase activity and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in a pharmacological model of mania. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 36: 39-46.
13. von Diemen, L., Kapczinski, F., Sordi, A.O., de Magalhães Narvaez, J.C., Guimarães, L.S., Kessler, F.H., Pfaffenseller, B., de Aguiar, B.W., **Gubert, C.** & Pechansky, F. (2014) Increase in brain-derived neurotrophic factor expression in early crack cocaine withdrawal. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17: 33-40.
14. Bristot, G., Ascoli, B., **Gubert, C.**, Panizzutti, B., Kapczinski, F. & Rosa, A.R. (2014) Progesterone and its metabolites as therapeutic targets in psychiatric disorders. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 6: 1-12.