

**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 microgлияis (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 contribuimos 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

TB	Transtorno Bipolar
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
FAST	Escala Breve de Funcionalidade
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
5-HTT	Transportador de serotonina
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
CACNA1C	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C
ANK3	Ankyrin-3
IL-1β	Interleucina-1 β
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
IL-6	Interleucina - 6
NFκB	Fator nuclear - κ B
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
GSK3β	Glicogênio sintase cinase 3 β
AMPH	D - anfetamina
DAT	Receptor de dopamina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
NPP	Nucleotídeo pirofosfatase/fosfosdiesterase
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
APRT	Adenina fosforibosiltransferase

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

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de episódios de humor e subtipos de transtorno bipolar.....	17
Figura 2. Visão geral da cascata do sistema purinérgico com os produtos, subprodutos e enzimas atuantes.....	28
Figura 3. Esquema do metabolismo dos nucleotídeos/nucleosídeos extracelulares via ectonucleotidases e a seletividade aos purinoreceptores.....	30
Figura 4. Visão geral de mecanismos mediados pelo P2X7R compartilhados por diferentes etiologias de doenças do sistema nervoso central.....	34
Figura 5. Representação de eventos de transdução de sinal após ativação do P2X7R na microglia.....	36
Figura 6. Estrutura esquemática do P2X7R diferenciando sua ação de canal iônico e abertura de poro.....	37
Figura 7. Topologia do P2X7R destacado o polimorfismo 1513A>C (Glu496Ala)....	135
Figura 8. Papel hipotético da inflamação e ativação microglial na fisiopatologia do TB.....	143
Figura 9. 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 eutimia (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).

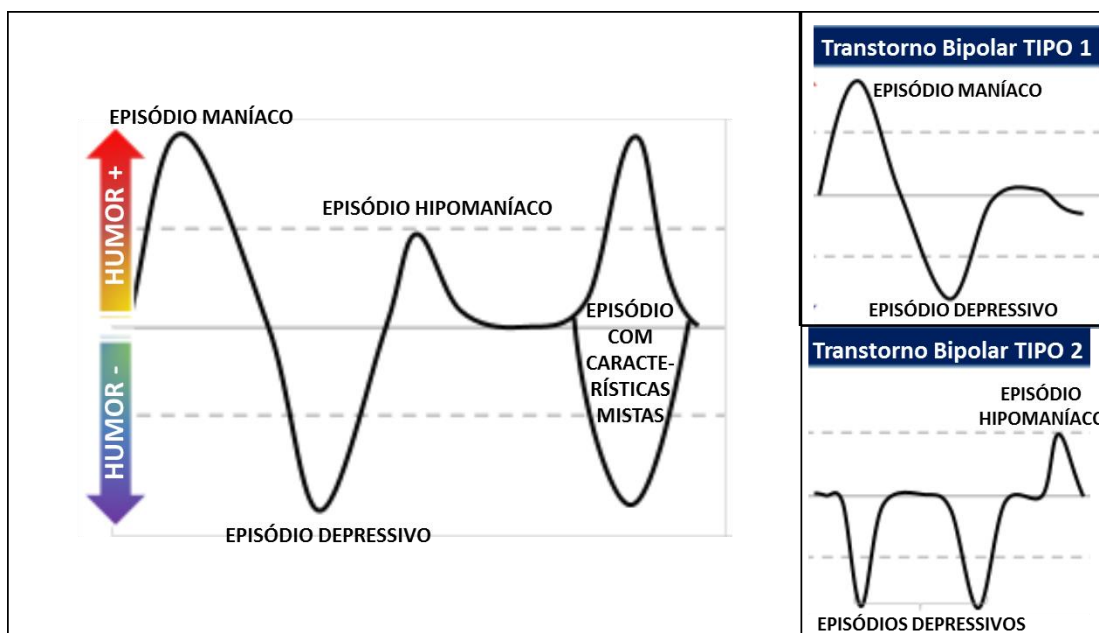


Figura 1. Esquema de episódios de humor e subtipos de transtorno bipolar. O curso da doença de um paciente pode ser registrado em gráfico de humor. Desse modo, um exemplo de como o humor pode variar é da hipomania para mania no topo da figura, para a eutímia (ou humor normal) no meio, e para a depressão 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 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) 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- α , IL-1 β assim como, um aumento do fator nuclear- κ B (NF κ 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 β (*IL-1 β*), receptor de IL-1 β e subunidades de NF- κ 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 β (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 *clock Δ 19*, camundongos que superexpressam a GSK3 β 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**).

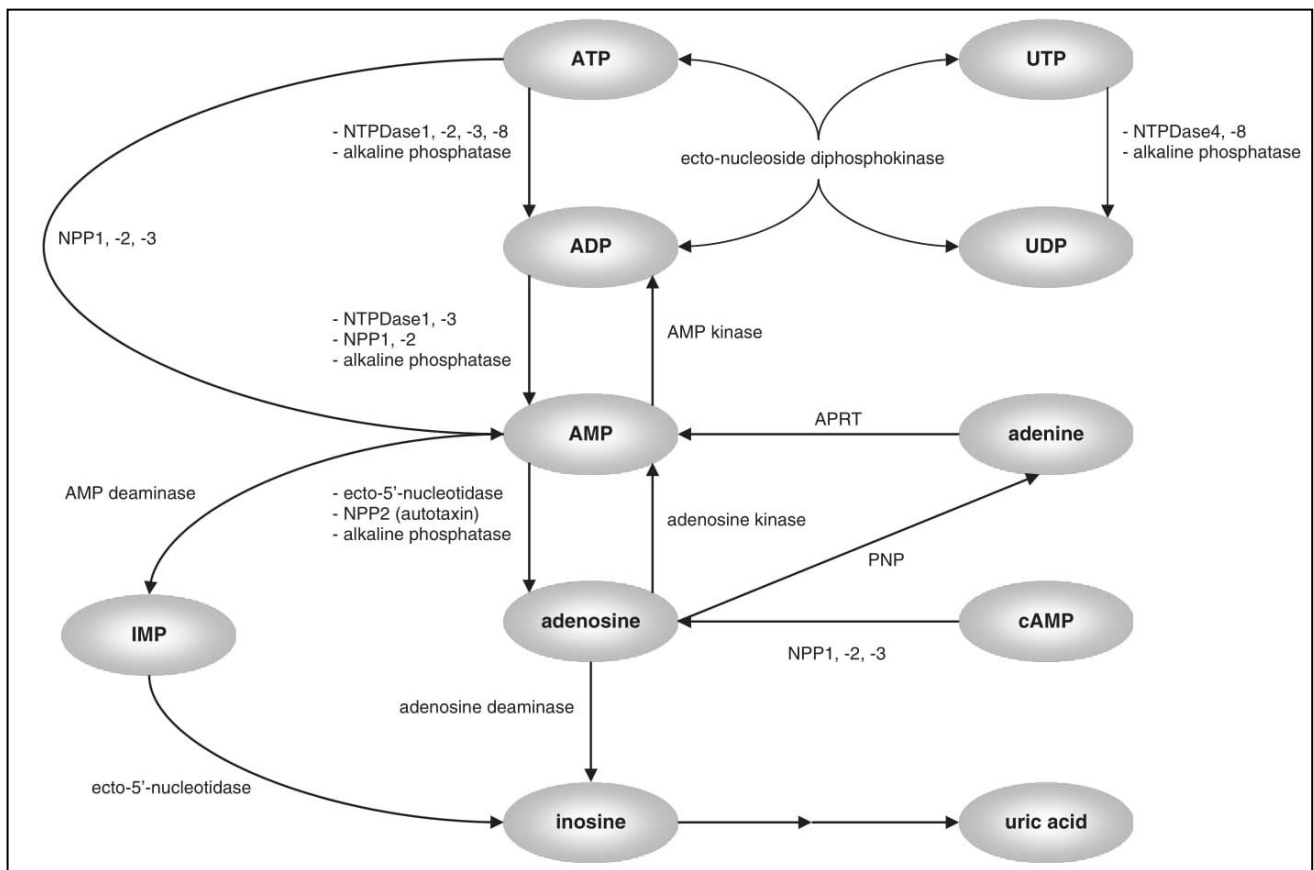


Figura 2. Visão geral da cascata do sistema purinérgico com os produtos, subprodutos e enzimas atuantes. NPP: nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; NTPDase: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; APRT: adenina fosforibosiltransferase; PNP: purina nucleosídeo fosforilase. (adaptado de Bours et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

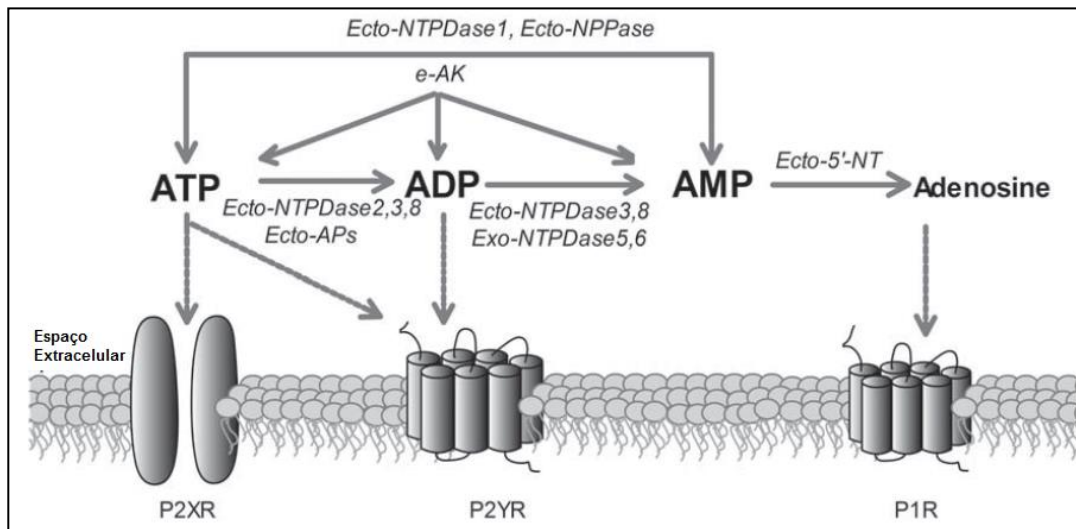


Figura 3. Esquema do metabolismo dos nucleotídeos/nucleosídeos extracelulares via ectonucleotidases e a seletividade aos purinoreceptores. Ecto-NTPDase: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; Ecto-NPPase: nucleotídeos pirofosfatase/fosfodiesterase; e-AK: ecto-adenilato cinase; Ecto-5'-NT: ecto-5'-nucleotidase; 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**).

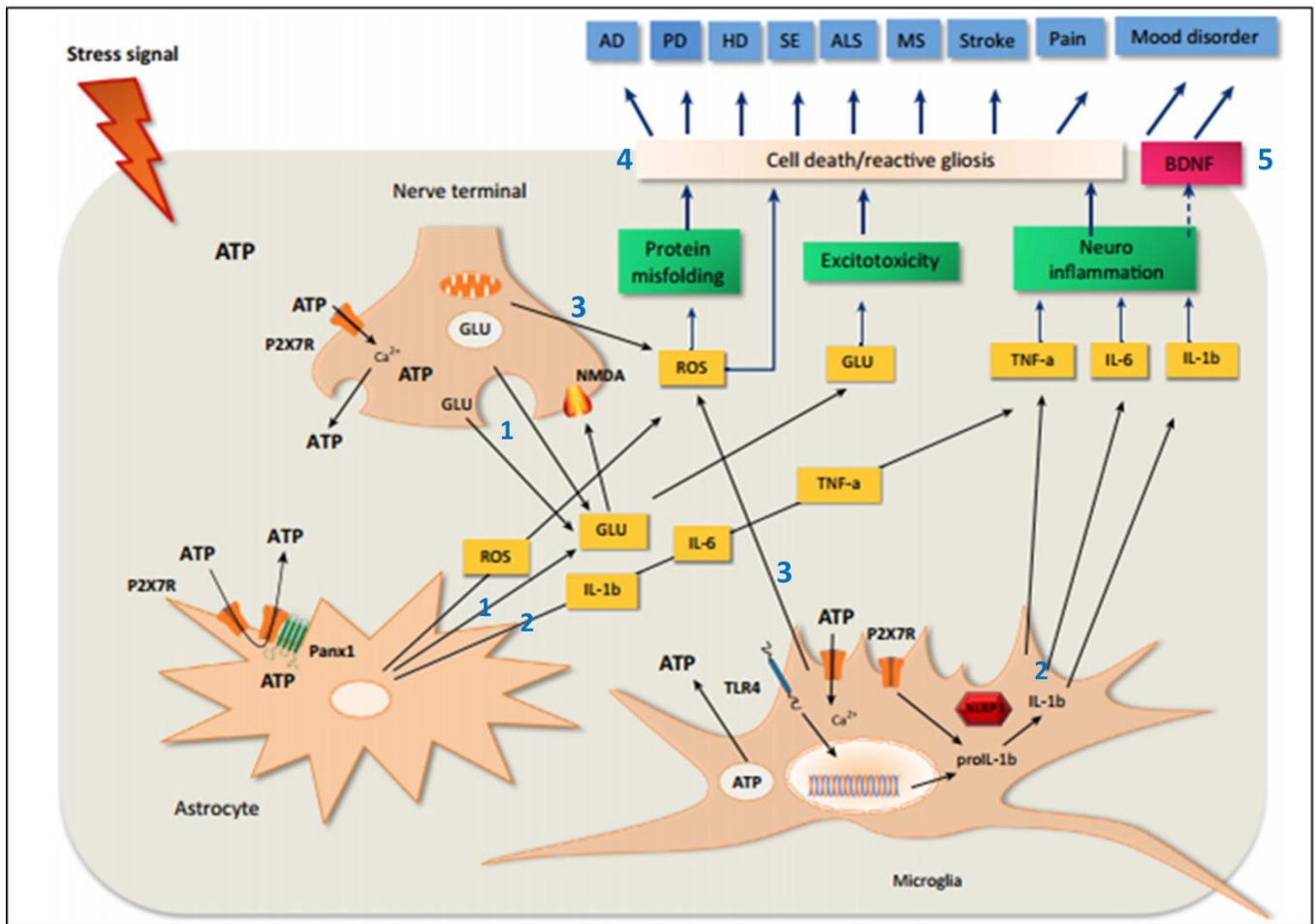


Figura 4. Visão geral de mecanismos mediados pelo P2X7R compartilhados por diferentes etiologias de doenças do sistema nervoso central. Sinais de estresse que levam ao aumento da concentração de ATP extracelular são capazes de desencadear a ativação de P2X7R de neurônios e células gliais. A ativação 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 (Ca^{2+} , Na^+ , 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).

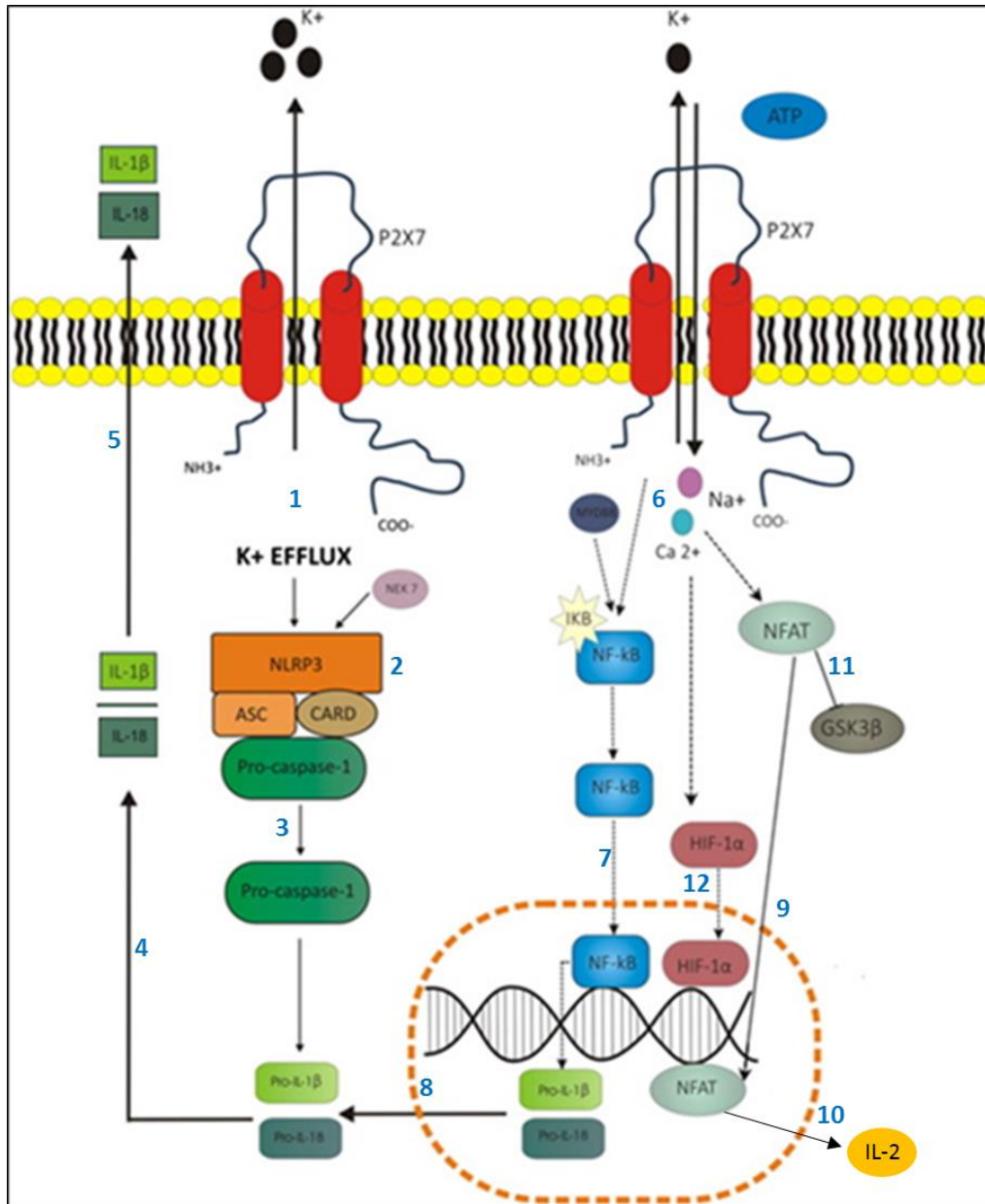


Figura 5. Representação de eventos de transdução de sinal após ativação do P2X7R na microglia. Após a ativação P2X7R, (1) K⁺ é liberado da célula causando a (2) montagem de inflammasoma NLRP3. O inflammasoma induz a (3) ativação da pro-caspase-1 em caspase-1, o que provoca a (4) maturação de pró-IL-1β e pró-IL18, (5) permitindo a liberação. Além disso, o P2X7R, (6) via influxo de Ca²⁺ promove a (7) translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB, induzindo a (8) expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias. Também desencadeia a (9) translocação de NFAT dependente de Ca²⁺ que por sua vez causa secreção (10) de IL-2 e (11) modulação negativa de GSK3β. Ainda, o P2X7R promove a (12) ativação do HIF-1α, 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).

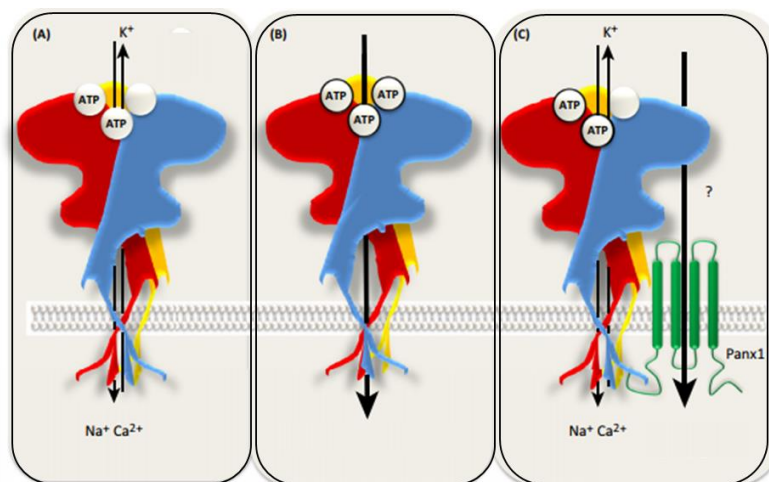


Figura 6. Estrutura esquemática do P2X7R diferenciando sua ação de canal iônico e abertura de poro. O P2X7R é um homotrímero, formando uma estrutura de cálice. São três os sítios de ligação ao ATP e estão localizados um em cada subunidade. (a) para a abertura do canal iônico é necessário a ocupação de 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 β , 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^{-/-}), 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**

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**

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**

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**

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- α (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.

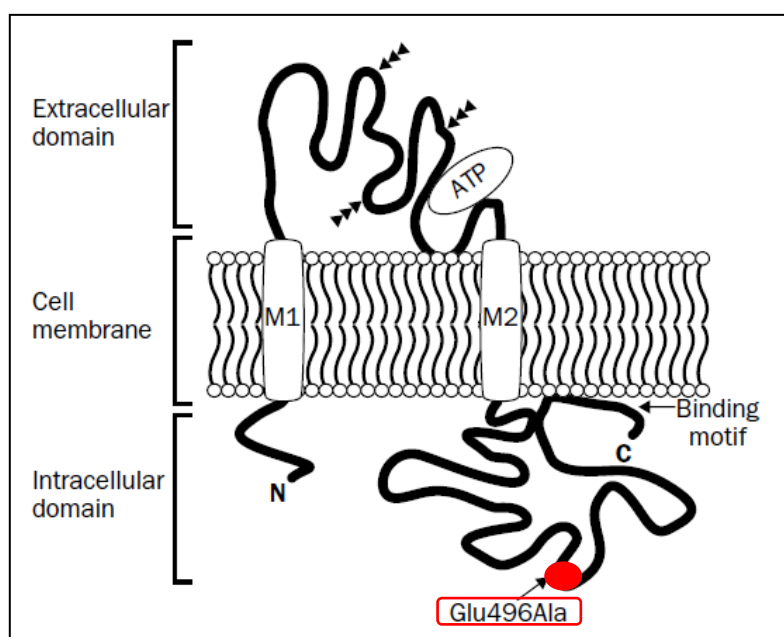


Figura 7. Topologia do P2X7R destacado o polimorfismo 1513A>C (Glu496Ala). (adaptado de Wiley et al. 2002).

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 3β (GSK3 β), 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).

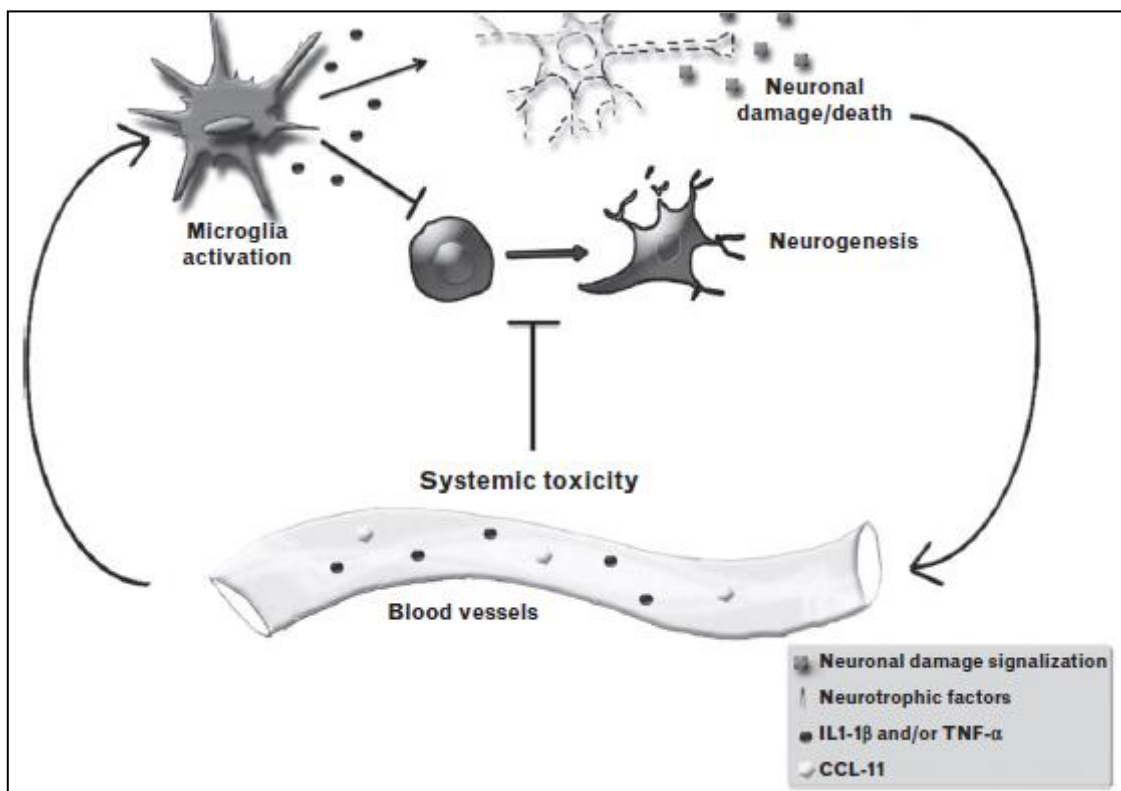


Figura 8. Papel hipotético da inflamação e ativação microglial na fisiopatologia do TB. Após episódios agudos, o excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias, que excedem a capacidade de reparo do sistema, mantêm a microglia em um estado constantemente ativado. A constância da presença de TNF- α e IL-1 β 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 β 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 α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α) 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.

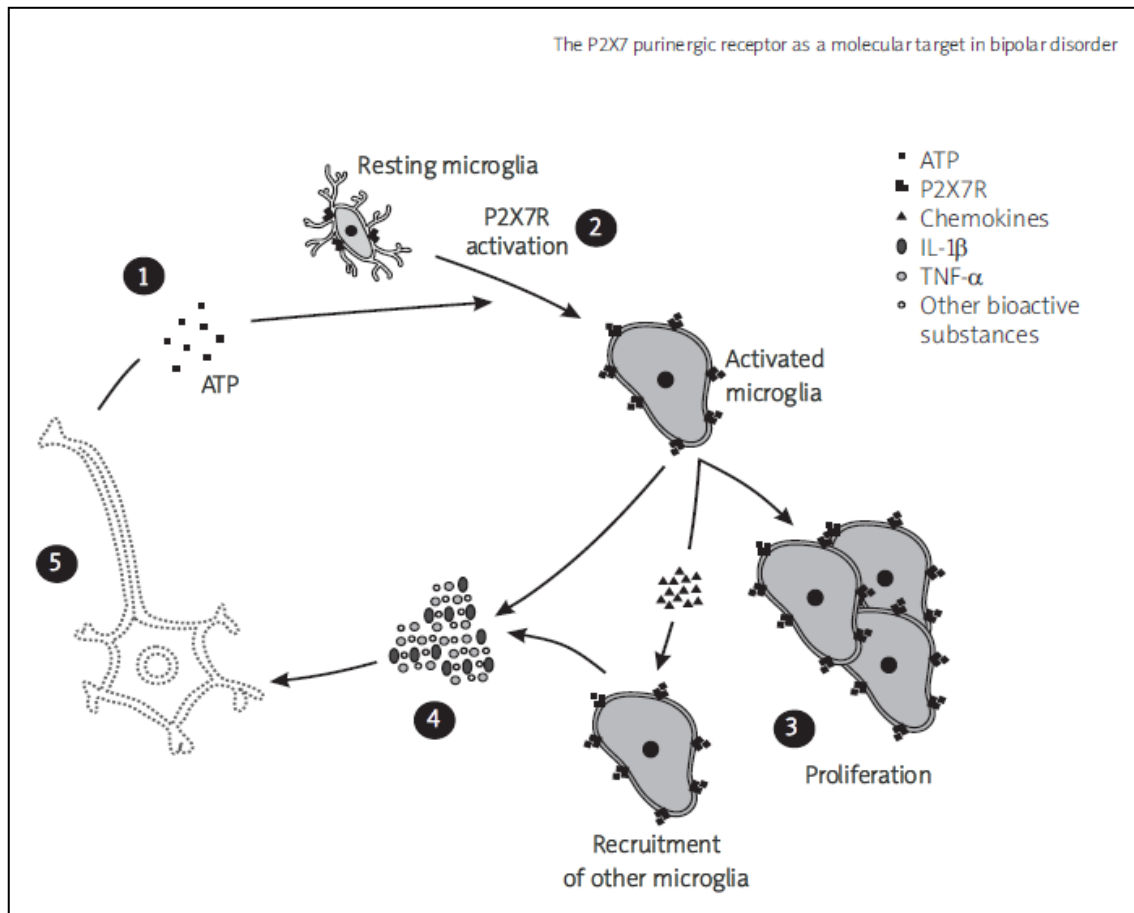


Figura 9. Diagrama esquemático da relação entre a ativação do P2X7R e a ativação microglial no TB. 1) Episódios agudos induzem dano neuronal causando a liberação de moléculas associadas a danos (DAMPs), como o ATP. 2) A liberação de ATP, em última instância, é capaz de converter as células microgliais 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 β , TNF- α) 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. Grobden 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). "Purinergetic 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). "Purinergetic 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 P2X₇ 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⁺ 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 β 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.

Wesseliuss, 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., Dominguíni, 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., Dominguíni, 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.