

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**Identificação de Padrões Gliais no Estriado em um Modelo Animal
de Mania: Um Estudo Piloto**

GIOVANA BRISTOT

Porto Alegre
Maio/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**Identificação de Padrões Gliais no Estriado em um Modelo Animal
de Mania: Um Estudo Piloto**

GIOVANA BRISTOT

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriane Ribeiro Rosa

Co-orientadora: MSc Bianca Pfaffenseller

*Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel(a) em Biomedicina.*

Porto Alegre

Maio/2014

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a Adriane Ribeiro Rosa, pela orientação, pelo incentivo e pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora MSc Bianca Pfaffenseller, pela dedicação, amizade, incentivo e disposição constante em ajudar.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular: Laura Stertz, Gabriel Fries, Gabriela Colpo, Bianca Aguiar, Bruna Panizzuti, Bruna Maria Ascoli, Carol Gubert, Pâmela Ferrari, Emily Galvão, André Contri, Maurício Barth, Eduarda Rosa e Thais Martini, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo apoio. Em especial à Laura, pelo importante auxílio na realização deste trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Psiquiatria Molecular, em especial ao Prof Flávio Kapczinski, por serem referência na área da pesquisa.

Ao Prof Luis Barbeito e à Sílvia Olivera-Bravo do Institut Pasteur de Montevideo, pela parceria e pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas da Turma 7 de Biomedicina, pelos anos de convívio; especialmente à Carla Basso, Édina Poletto, Nicole Sartori e Pâmela Menegotto, amigas mais do que especiais que a faculdade me proporcionou.

À minha família, pelo apoio constante, pela confiança, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, e acima de tudo pelo amor.

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	
1. Transtorno Bipolar	
1.1. Definição e Epidemiologia	6
1.2. Fisiopatologia do Transtorno Bipolar	7
1.2.1. Neurotrofinas, Marcadores Inflamatórios e Estresse Oxidativo	7
1.2.2. Alterações Neuroanatômicas: Estriado	9
2. Modelos Animais em Psiquiatria	12
3. Células Gliais e Transtorno Bipolar	14
3.1. Astrócitos	15
3.1.1. S100B	17
3.1.2. Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)	18
3.1.3. Glutamina Sintetase (GS)	19
3.2. Células da Microglia	20
3.2.1. Iba1: Marcador de Microglia Ativada	22
3.3. Astrogliose e Microgliose	23
4. Justificativa	25
TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	46
REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	48

Resumo

Estudos recentes sugerem o envolvimento de alterações em células gliais na fisiopatologia do transtorno bipolar e de outras doenças psiquiátricas como esquizofrenia e depressão maior. Sabe-se que astrócitos e microglia exercem funções essenciais no sistema nervoso central, estando envolvidos principalmente na manutenção da homeostase e promoção de um ambiente celular adequado. No entanto, quando ativadas, estas células podem exercer efeito negativo sobre os eventos tróficos em vias neurais lesadas. Desta maneira, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar possíveis alterações em astrócitos e em células microgliais no estriado de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina (LDX). O experimento foi realizado em um modelo no qual ratos Wistar machos (n = 16) receberam por via oral diariamente, ao longo de sete dias, LDX 10 mg/kg (n = 8) – grupo LDX, ou água destilada (n = 8) – grupo controle; no oitavo dia os ratos receberam uma última administração de LDX ou água destilada e em seguida cada grupo foi dividido em quatro subgrupos, os quais foram submetidos à eutanásia em momentos distintos - 2 horas, 24 horas, 15 dias e 21 dias após a última administração. Os animais foram perfundidos com salina 0,9 % seguido por perfusão com paraformaldeído (PFA) 10 % em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4. Após a eutanásia, os cérebros dos ratos foram removidos e pós-fixados com PFA 10 % (24 h, 4 °C) e permaneceram em tampão fosfato até a separação do estriado e posterior secção da estrutura (secções com aproximadamente 50 µm de espessura) usando um vibrátomo. Em seguida, foi realizada imuno-histoquímica usando anticorpos primários com o objetivo de avaliar os marcadores de astrócitos GFAP (proteína ácida fibrilar glial), S100B e GS (glutamina sintetase) e o marcador de microglia Iba1, além de anticorpos secundários apropriados conjugados a fluorocromos. As imunomarcações foram visualizadas por meio de microscopia confocal. Neste estudo, cujos resultados ainda são preliminares devido ao limitado número de animais utilizados até o momento, observamos que houve um aumento no número de células positivas para os marcadores de astrócitos S100B, GFAP e GS nos animais tratados com LDX em relação ao grupo controle na maioria das condições experimentais investigadas. Adicionalmente, notamos também um aumento na quantidade de células Iba1+ no grupo LDX quando comparado ao grupo controle, nas condições referentes a 2 horas e 24 horas, o que representa um aumento no número de células microgliais ativadas. Embora ainda não seja possível avaliar se estas diferenças são estatisticamente significativas, a interpretação conjunta dos dados obtidos nos permite sugerir que possa estar ocorrendo microgliose e astrogliose reativas nos animais que receberam LDX, o que reforçaria a hipótese de que a microglia poderia estar levando à ativação de astrócitos por meio de mediadores inflamatórios, e iria ao encontro de estudos recentes que mostram a presença de um estado pró-inflamatório durante episódios agudos no transtorno bipolar. Contudo, mais estudos são necessários para que seja possível garantir poder estatístico adequado ao trabalho e assim comprovar os dados obtidos até o momento.

Abstract

Recent studies have suggested the involvement of changes in glial cells in the pathophysiology of bipolar disorder and other psychiatric disorders as schizophrenia and major depression. It is known that astrocytes and microglia have essential roles in the central nervous system, mainly maintaining the homeostasis and promoting an appropriate cellular setting. However, when these cells are activated, they can exert a negative effect on trophic processes in damaged neural pathways. In this way the objective of this study was evaluate possible changes in astrocytes and microglial cells in the striatum of Wistar rats of an animal model of mania induced by lisdexamfetamine dimesylate (LDX). Male Wistar rats (n=16) received daily, via oral route, for seven days, LDX 10 mg/kg (n=8) – LDX group, or distilled water (n=8) – control group; on the eighth day, rats received the last LDX or distilled water administration and each group was separated into four subgroups, which were euthanized in different moments – 2 hours, 24 hours, 15 days and 21 days after the last administration. Animals were perfused transcardially using saline (0,9 %) followed by paraformaldehyde (PFA) 10 % in phosphate buffer 0,1 M and pH 7,4. After euthanasia, rats' brain were removed, post-fixed with PFA 10 % (24 h, 4 °C) and maintained in phosphate buffer until striatum be separated; and subsequently sections (50 µm) were cut on a vibratome. Afterwards, immunohistochemistry was performed using primary antibodies to evaluate the astrocyte markers GFAP (glial fibrillary acidic protein), S100B and GS (glutamine synthetase) and the microglial staining Iba1, and appropriate fluorochrome-conjugated secondary antibodies. Immunostaining were analyzed using confocal microscopy. In this study, which has preliminary results due to the limited animal number analyzed so far, we have noted that there is an increase in the number of positive cells to astrocyte markers in the animals which received LDX compared to control group in most experimental conditions. Additionally, we have observed an increase in the number of Iba1+ cells in LDX group compared to control group, in 2 hours and 24 hours conditions, that could represent microglial activation. Although it was not possible yet establish whether these differences are statistically significant, the data together suggest that a possible reactive microgliosis and astrogliosis may be present in animals which received LDX, what would support the hypothesis that microglia may be driving to an astrocyte activation through inflammatory mediators like suggested by other current studies which show a pro-inflammatory status during acute episodes in bipolar disorder. Nonetheless, more studies are warranted to be possible ensure an adequate statistical power for the study and prove the findings gotten so far.

INTRODUÇÃO

1. Transtorno Bipolar

1.1. Definição e Epidemiologia

O transtorno bipolar (TB) é uma doença mental grave, de caráter crônico e recorrente e que se caracteriza por oscilações no estado de humor, resultando em episódios de mania ou depressão, os quais variam em intensidade, duração e frequência (Goodwin e Jamison, 1991). Dados recentes mostram que o TB é uma das dez condições mais incapacitantes; pacientes bipolares frequentemente apresentam déficits cognitivos relacionados com a memória e o aprendizado, o que influi diretamente no seu funcionamento psicossocial (Kilbourne *et al.*, 2009). Nos últimos anos, tem-se observado um aumento na prevalência do TB, a qual figura em termos mundiais, em torno de 2,4 % segundo dados bibliográficos recentes (Merikangas *et al.*, 2011).

O TB é uma doença que geralmente se manifesta entre o fim da adolescência e início da idade adulta (Kaplan *et al.*, 1998). No entanto, boa parte dos pacientes recebe inicialmente um diagnóstico errôneo, sendo tratados como deprimidos - devido à presença dos episódios depressivos, ou até mesmo como esquizofrênicos - devido aos episódios psicóticos. Estima-se que o correto diagnóstico e implementação do tratamento mais adequado possa levar em torno de 10 anos, o que conseqüentemente leva à piora do estado do indivíduo com TB, resultando em prejuízos não somente para os pacientes, mas também para as famílias e para a sociedade (Gazalle *et al.*, 2005).

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

Segundo o DSM-IV-TR (APA, 2002), a hipomania consiste em um estado de euforia, porém não envolve um estado severo a ponto de causar prejuízos funcionais acentuados no âmbito familiar, social ou ocupacional ou apresentar sintomas psicóticos ou haver necessidade de internação, não satisfazendo desta maneira os critérios diagnósticos necessários a um episódio de mania completo. Este último, no

entanto, pode ser descrito como um estado de humor expansivo ou irritável, no qual o indivíduo, em geral, apresenta desorganização e impulsividade comportamentais, energia em alta, redução significativa do sono, sentimento de grandiosidade, profusões de ideias, verborreia e consumo elevado de álcool, café e cigarro. Em contrapartida, durante episódios depressivos, o indivíduo apresenta-se melancólico e pessimista, além de poder apresentar comportamentos e pensamentos lentificados, sensação de fadiga, queixas de ordem somática, desinteresse por atividades as quais habitualmente lhe dariam prazer, aumento ou redução do sono e ideação suicida (Suppes e Dennehy, 2009).

O prognóstico de pacientes com TB está diretamente relacionado com a duração da doença assim como com o número de episódios. Pacientes com múltiplos episódios e longa duração da doença, por exemplo, tendem a ser mais graves que aqueles com poucos episódios, e isto parece comprometer o dia-a-dia destes indivíduos no que diz respeito ao desempenho social e ocupacional dos mesmos (Souza, 2005; Rocca e Lafer, 2006). No entanto, entre os episódios de mania ou hipomania e depressão, o indivíduo com TB apresenta períodos subsindrômicos e de eutimia, a qual consiste na remissão dos sintomas de humor (Souza, 2005).

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

1.2. Fisiopatologia do Transtorno Bipolar

1.2.1. Neurotrofinas, marcadores inflamatórios e estresse oxidativo

Embora a fisiopatologia do TB ainda não esteja completamente elucidada, grandes avanços visando o esclarecimento da mesma têm sido relatados. Dentre os diversos estudos realizados nos últimos anos referentes a este tema, percebe-se que achados significativos concentram-se nas vias biológicas relacionadas a neurotrofinas, inflamação e estresse oxidativo, as quais estão ligadas à

neuroplasticidade, ou seja, a uma espécie de remapeamento das conexões entre as células nervosas (Post, 2007).

As neurotrofinas são peptídeos encontrados no sistema nervoso central (SNC) e que são importantes para o crescimento, diferenciação e sobrevivência das células nervosas. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é a neurotrofina mais abundante no tecido nervoso e encontra-se amplamente distribuída no SNC; sua importância já foi descrita em diversos processos neuronais relacionados ao desenvolvimento neuronal, neurogênese, sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, arborização dendrítica e memória de longa duração (Post, 2007).

Estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado uma importante relação entre BDNF e transtornos psiquiátricos, entre eles o TB, evidenciando uma redução nos níveis séricos desta neurotrofina em indivíduos com diagnóstico de TB durante episódios maníacos e depressivos, quando comparados a pacientes eutímicos e controles saudáveis (Cunha *et al.*, 2006 – Fernandes *et al.*, 2011). Níveis reduzidos de BDNF podem levar a uma deficiência no suporte neurotrófico durante o desenvolvimento cerebral, causando uma proliferação neuronal diminuída ou uma poda de sinapses excessiva, tendo como resultado uma diminuição no número de sinapses (Selemon *et al.*, 1995; Glantz e Lewis, 2000). Uma vez consolidada esta relação entre TB e BDNF, atribui-se ao BDNF uma contribuição essencial no que diz respeito ao entendimento da fisiopatologia do TB, sendo esta neurotrofina um possível biomarcador deste transtorno.

Além disso, estudos voltados ao papel da inflamação durante o curso clínico do TB demonstraram que alterações imunológicas estariam relacionadas à progressão da doença e a elevados índices de comorbidades (Leboyer *et al.*, 2012), assim como à severidade e à recorrência de episódios de humor (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2009). Como meio comprobatório destes achados, tem sido relatada a presença de um estado pro-inflamatório em pacientes bipolares durante episódios de humor, nos quais se observou um aumento nos níveis periféricos de citocinas pró-inflamatórias - IL-6 e TNF- α no decorrer de episódios depressivos; e IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α durante episódios de mania - quando comparados a pacientes em eutimia e controles saudáveis (Ortiz-Domínguez, *et al.*, 2007; Brietzke *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo (EO), como mencionado anteriormente, também tem sido estudado nos últimos anos com o objetivo de elucidar a sua relação com a

fisiopatologia do TB. O EO é definido como uma condição biológica na qual ocorre um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes. Recentemente, um estudo conduzido na Inglaterra mostrou que pacientes com TB apresentam menores níveis plasmáticos de glutathione total em comparação ao grupo controle, evidenciando o papel do EO na fisiopatologia do TB (Rosa *et al.*, 2014). Esse desequilíbrio pode resultar em um dano a macromoléculas biológicas, como lipídios, proteínas e ao próprio DNA.

O SNC apresenta um alto consumo de oxigênio, o que pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Por ser a mitocôndria a maior fonte de radicais livres, a hipótese mais aceita atualmente é que o EO presente no TB é decorrente de uma disfunção mitocondrial. Em 2007, Andreatza e colaboradores demonstraram que pacientes com TB possuíam um aumento na frequência de dano ao DNA, a qual possivelmente teria sido causada por EROs, e este dano apresentou uma correlação positiva com a severidade de sintomas maníacos e depressivos (Andreatza *et al.*, 2007).

Em estudos recentes, alterações neuroanatômicas têm sido associadas à progressão da doença no TB. Atrofia cortical e aumento dos ventrículos, por exemplo, são mais pronunciadas em pacientes com mais tempo de doença e com episódios de humor repetidos em relação a pacientes com menos episódios e menor tempo de doença (Pfaffenseller *et al.*, 2012).

Além do mais, há evidências que apontam fatores genéticos, regulação da expressão gênica e vias de sinalização neuro-humorais possivelmente envolvidos com a fisiopatologia do TB (Kapczinski *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos sugerem que alterações funcionais e estruturais em pacientes bipolares podem estar relacionadas à rede de conexões límbicas anteriores, incluindo os gânglios basais (Shahana *et al.*, 2011).

1.2.2. Alterações Neuroanatômicas: Estriado

O estriado faz parte dos núcleos da base, termo este utilizado para designar estruturas constituídas por diferentes porções de matéria cinzenta e que se localizam na porção subcortical de cada hemisfério cerebral, sendo que os principais núcleos constituintes dos núcleos da base são: o estriado, o globo pálido, a substância negra

(*pars reticulata e pars compacta*) e o núcleo subtalâmico. O núcleo caudado, o putâmen e o estriado ventral (que inclui o núcleo accumbens) formam o estriado (Kandel *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 2013).

A etiologia do nome é latina – *striatum* – devido às estrias que são observadas nesta estrutura, em especial quando observada ao microscópio (Lent, 2001). Estas estrias são provenientes de axônios mielinizados da porção interior da cápsula interna, a qual em humanos atravessa o estriado de modo a separar, porém de maneira incompleta, o caudado do putâmen. Em roedores, no entanto, o caudado e o putâmen representam uma única estrutura (Mink, 1999).

Os neurônios que constituem o estriado são em sua grande maioria (cerca de 95%) do tipo espinhosos médios, os quais utilizam GABA como neurotransmissor; há também os interneurônios estriatais (cerca de 1 % a 2 %), os quais são neurônios do tipo não-espinhosos e fazem conexões com os espinhosos médios (Mink, 1999).

Os núcleos da base possuem uma série de conexões aferentes, eferentes e internas, sendo que o estriado é considerado a porta de entrada principal para muitas destas aferências (Lent, 2001). Em relação às aferentes, existem dois tipos principais de conexões, ambas excitatórias, para os núcleos da base: provenientes do córtex cerebral (em especial das áreas pré-frontal, pré-motoras, motoras, sensoriais - exceto córtex visual e auditivo primário - e límbicas) e dos núcleos intralaminares do tálamo, o que constitui as via corticoestriada e a via talamoestriatal, respectivamente (Mink, 1999; Barret *et al.*, 2014). As duas principais conexões eferentes dos núcleos da base, por sua vez, são inibitórias (GABAérgicas) e projetam-se para o tálamo, sendo provenientes do globo pálido interno e da parte reticular da substância negra. Por fim, as conexões internas incluem, entre outras, uma projeção nigroestriatal dopaminérgica a partir da porção compacta da substância negra para o estriado e uma projeção GABAérgica a partir do estriado para a parte reticular da substância negra (Barret *et al.*, 2014).

O estriado está envolvido no controle de movimentos sequenciais, na regulação do tônus e da força muscular (Lundy-Ekman, 2004). O caudado participa na cognição e no controle do movimento dos olhos; o putâmen é em grande parte responsável pelo controle do movimento do tronco e dos membros; já o núcleo accumbens, juntamente com as porções adjacentes do núcleo caudado e putâmen, atua no controle das emoções (Martin *et al.*, 2013).

O estriado é o núcleo de entrada primário das aferências provenientes da região cortical; desta maneira, compreender a função exercida pelo estriado nos transtornos de humor pode representar um importante passo em relação ao esclarecimento da função deste circuito (região cortical - gânglios basais) como um todo. Além disso, os circuitos que envolvem as conexões entre a região cortical e os gânglios basais estão relacionados a funções tais como o controle motor e o aprendizado, bem como ao processamento cognitivo e emocional (Marchand e Yurgelun-Todd, 2010). Anormalidades nestes circuitos têm sido associadas aos transtornos de humor (Marchand *et al.*, 2012).

Uma série de estudos tem demonstrado, por meio do uso de técnicas de neuroimagem como ressonância magnética, tomografia computadorizada, tomografia por emissão de pósitrons e tomografia por emissão de fóton único, anormalidades estruturais e funcionais relacionadas aos gânglios basais de pacientes bipolares, em especial no núcleo caudado; um aumento no volume desta estrutura foi observado em pacientes com TB quando comparados a controles saudáveis (Aylward *et al.*, 1994; Strakowski *et al.*, 1999; DelBello *et al.*, 2004). Além disso, alguns estudos demonstraram a presença de hiperatividade estriatal e talâmica em pacientes com TB, embora outros estudos reportem achados que conflitem com os primeiros (Marchand e Yurgelun-Todd, 2010).

Marchand e colaboradores sugerem uma relação entre desinibição comportamental, função estriatal e risco de suicídio em transtornos bipolares: a disfunção estriatal, por meio de seu papel na desinibição comportamental, pode estar relacionada a um comportamento suicida (Marchand *et al.*, 2011). Esta hipótese baseia-se em estudos que relatam que a impulsividade está aumentada em pacientes com TB independente de seus estados de humor (Swann, 2010) e que o lítio especificamente diminui a impulsividade, por meio de um mecanismo de ação que consiste em diminuir a liberação de dopamina no estriado (Kovacsics *et al.*, 2009; Marchand *et al.*, 2011).

Adicionalmente, estudos demonstraram que pacientes com TB apresentam um aumento significativo do volume do estriado e dos demais gânglios basais (Strakowski *et al.*, 2002; Hajek *et al.*, 2005; Strakowski *et al.*, 2005), enquanto outros não relataram alterações volumétricas significativas ao comparar os gânglios basais de pacientes bipolares com controles saudáveis (Machado-Vieira *et al.*, 2005).

Também neste contexto, um estudo demonstrou, em especial em bipolares tipo I, uma relação inversa entre a idade e o volume do putâmen, dado este que aponta para possíveis alterações neurodegenerativas relacionadas com a idade nesta região (Machado-Vieira *et al.*, 2005).

2. Modelos Animais em Psiquiatria

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

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

Alguns modelos animais de TB têm sido propostos, porém o transtorno apresenta algumas características complexas, destacando-se a recorrência e a ciclicidade da doença, as quais são difíceis de serem mimetizadas em animais e representam uma limitação neste tipo de estudo pré-clínico (Kapczinski *et al.*, 2009). Sendo assim, os modelos animais para TB tendem a focar em apenas um dos pólos do transtorno, procurando mimetizar o episódio depressivo ou o episódio maníaco da doença, uma vez que até o momento não foi possível induzir alterações de humor

cíclicas em animais de maneira similar às apresentadas pelos pacientes. Neste sentido, há drogas que apresentam a capacidade de induzir sintomas semelhantes aos da mania, como por exemplo alterações no sono, hiperlocomoção, hiperatividade, aumento do impulso sexual, entre outros (Davies *et al.*, 1974; Fiorino e Phillips, 1999). Entre elas, a D-anfetamina (D-AMPH), que é um estimulante dopaminérgico tem sido empregada no desenvolvimento de modelos animais de mania (Einat, 2006; Frey *et al.*, 2006a; Frey *et al.*, 2006b).

A dopamina (DA) é um neurotransmissor catecolamínico altamente presente no SNC, envolvido em uma variedade de funções essenciais relacionadas ao comportamento e a cognição, atenção e aprendizagem, motivação e recompensa, entre outras; o que a leva a estar implicada em vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos (Klanker *et al.*, 2013). A DA exerce um papel essencial na regulação do humor e das funções cognitivas, sendo que alterações na transmissão dopaminérgica têm sido observadas no TB (Beaulieu e Gainetdinov, 2011). Estudos já relataram evidências de disfunções no metabolismo da DA no TB, sendo que estes achados estão relacionados à indução de mania devido ao uso de psicoestimulantes com propriedades dopaminérgicas, como as anfetaminas, que promovem a liberação de DA nos terminais neuronais pré-sinápticos, aumentando os níveis de DA na sinapse (Jones *et al.*, 1998). Além disso, também foi relatada uma associação entre o TB e polimorfismos em genes como o da dopamina beta-hidroxilase, uma enzima que converte dopamina em noradrenalina (Machado-Vieira *et al.*, 2005).

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

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

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

3. Células Gliais e Transtorno Bipolar

O SNC é constituído basicamente por neurônios e pelas células gliais (neuroglia). A neuroglia pode ser classificada em dois grupos que se distinguem morfológica e funcionalmente, possuindo origens embriológicas distintas: a macroglia, de origem ectodérmica; e a microglia, de origem mesodérmica. A macroglia compreende a oligodendroglia; a ependimoglia, formada pelos ependimócitos, células epiteliais pigmentares e células do plexo corioideo; e a astroglia, que inclui os astrócitos, presentes em diversas regiões do SNC e são a

principal fonte de fatores de crescimento para os neurônios. A microglia possui como principal função a defesa imune do SNC e geralmente é recrutada após lesões, infecções ou doenças neurodegenerativas do sistema nervoso; uma vez que a microglia é ativada no sítio da lesão, a mesma passa a sofrer alterações morfológicas e torna-se hábil para proliferar e realizar fagocitose (Gomes *et al.*, 2013).

Desta maneira, as células gliais são constituintes essenciais do sistema nervoso, e possuem funções importantes na manutenção da homeostase (astrócitos), mielinização (oligodendrócitos) e promoção de um ambiente cerebral adequado (microglia). Sabe-se que os astrócitos estão envolvidos em mecanismos de sinalização relacionados ao estado de sobrevivência ou de morte neuronal (Stromberg *et al.*, 1986) e tem sido postulado que estas células, e também a microglia, quando ativadas, exercem uma influência nos eventos tróficos nas vias neuronais lesadas e locais sensíveis à agressão (Giulian *et al.*, 1996; Leme e Chadi, 2001). Este processo de reatividade astrocitária é ambíguo e pode causar um efeito contraditório, pois em alguns casos exerce um efeito neuroprotetor e, em outros, um efeito negativo que conduz à perda sináptica e à morte neuronal (Gomes *et al.*, 2013).

3.1. Astrócitos

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células da glia presentes no SNC dos mamíferos e compreendem um grupo heterogêneo de células, com distintos subtipos e que possuem variações no que diz respeito a sua morfologia, desenvolvimento, metabolismo e fisiologia. Dentre estes subtipos, destacam-se os astrócitos protoplasmáticos, localizados na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos, situados na substância branca.

Os astrócitos possuem funções importantes para a homeostase, o que inclui a manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, além de outras atuações funcionais, dentre as quais se destacam: sua capacidade proliferativa formando cicatriz glial ao redor de lesões (gliose), produção e liberação de fatores tróficos que contribuem para a sobrevivência de neurônios, participação na formação da barreira hemato-encefálica e na reposição de íons e moléculas envolvidos na transmissão sináptica.

No SNC há uma constante transferência de informações a qual se baseia na transmissão sináptica, um processo complexo e que apresenta fundamental importância durante o desenvolvimento humano (Gomes, 2013). Essa transmissão sináptica forma o alicerce para atividades superiores tais como o aprendizado, memória, percepção e cognição (Gomes, 2013). As sinapses são consideradas elementos centrais funcionais do sistema nervoso e são representadas, de forma clássica, como uma região em que ocorre o encontro de um neurônio pré-sináptico com um neurônio pós-sináptico (*sinapse bipartite*). Entretanto, nos últimos anos, estudos têm apontado para um importante papel dos astrócitos nas diversas etapas de formação, eliminação, estabilização e eficácia das sinapses (Stipursky *et al.*, 2010; 2011; 2012). Estes achados conduziram a uma mudança neste cenário, no qual as células gliais passaram a ter também um importante papel na função cerebral. Assim, acredita-se hoje que a atividade cerebral seja coordenada por uma rede de eventos, da qual fazem parte tanto os neurônios como as células gliais (Araque e Perea, 2004; Perea *et al.*, 2009). Então, o termo *sinapse tripartite* começou a ser aplicado para exemplificar a existência de uma comunicação bidirecional entre os neurônios e os astrócitos no ambiente sináptico. Isto poderia representar não somente uma relação física entre os neurônios e os processos astrogliais nos terminais sinápticos, mas também uma relação funcional entre células gliais e neurônios, tendo em vista que estes dois tipos celulares distintos trocam informações, moléculas, neurotransmissores e fatores tróficos (Gomes, 2013). Mais recentemente, no entanto, alguns estudos tem proposto o conceito de *sinapse quad-partite*, a qual inclui a participação da microglia nas sinapses químicas, com o importante papel no processo de eliminação e estabilização de sinapses (Schafer *et al.*, 2013).

Os filamentos intermediários gliais, cujo componente principal é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Bondan *et al.*, 2003), são constituintes dos astrócitos maduros. Além disso, a presença da proteína ligadora de cálcio S100B e da glutamina sintetase, a enzima responsável pela conversão de glutamato em glutamina, são características gerais deste tipo celular glial (Gomes, 2013). Desta forma, GFAP, S100B e glutamina sintetase representam marcadores antigênicos para a célula astrocitária. Recentemente, outro marcador astrocitário, a aldeído desidrogenase 1 (Aldh1L1) foi identificada tendo como ação catalisar as reações de oxidação de aldeídos (Cahoy *et al.*, 2008).

3.1.1. S100B

A S100B é uma proteína pertencente à família de proteínas S100, assim denominadas pelo fato de serem solúveis em uma solução 100% de sulfato de amônio. A S100B é uma proteína ligante de cálcio do tipo *EF-hand* (hélice-loop-hélice) e possui dois sítios nos quais o cálcio pode ligar-se (Fritz e Heizmann, 2004). Do ponto de vista estrutural, a S100B forma homodímeros constituídos por duas subunidades β unidos por pontes dissulfeto e que têm a capacidade de se ligar a proteínas alvo (Donato, 2003).

A S100B está presente no citoplasma das células (Pinto *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2007) e é glial-específica, sendo expressa principalmente por astrócitos. Uma vez produzida e secretada, a S100B é capaz de exercer efeitos parácrinos e autócrinos sobre neurônios e outras células gliais. Esta proteína possui diversas funções intracelulares, tais como: inibe a fosforilação de certas proteínas, por exemplo GFAP e p53; participa na regulação do metabolismo energético cerebral, na modulação da proliferação e diferenciação de células neuronais e gliais, além de atuar na regulação da homeostase do cálcio e exercer influência sobre a integridade do citoesqueleto (Donato, 2003; Rothermundt *et al.*, 2003).

Em nível extracelular, os efeitos exercidos pela S100B vão depender da concentração em que esta proteína é secretada, e por isso acredita-se que a S100B exerça um efeito dual, ou seja, em concentrações baixas (doses nM) ela apresenta um efeito neurotrófico promovendo o crescimento de neuritos e protegendo os neurônios contra a excitotoxicidade do glutamato (Ahlemeyer *et al.*, 2000; Huttunen *et al.*, 2000; Kögel *et al.*, 2004), enquanto que em concentrações elevadas (doses μ M) ela pode ser neurotóxica e induzir a apoptose (Van Eldik e Wainwright, 2003).

Rothermundt e colaboradores (2003) demonstraram um aumento na concentração de S100B tanto periféricamente como no SNC (fluido cefalorraquidiano) em resposta à ativação glial. Tais achados sugerem que a proteína S100 possa ser usada como um marcador de lesão cerebral aguda ou crônica.

Alterações nos níveis proteicos de S100B sérica em pacientes com transtornos de humor foram encontradas, o que representa um indicativo do envolvimento da glia na patogênese deste tipo de transtorno (Schroeter *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que as concentrações de S100B são maiores em pacientes deprimidos em relação a controles (Schroeter *et al.*, 2013) e também que esta proteína está aumentada em pacientes com esquizofrenia comparados a controles, estando os níveis protéicos de S100B correlacionados com o gênero, idade, medicação e severidade da doença (Rothermundt *et al.*, 2007; Ryoun *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Dagdan *et al.*, 2011). Além disso, estudos relataram um aumento significativo dos níveis séricos de S100B em pacientes bipolares durante os episódios maníacos e depressivos (Andreazza *et al.*, 2007; Machado-Vieira *et al.*, 2002; Schroeter *et al.*, 2013). É válido destacar que a S100B também é expressa em células do sistema imune e em adipócitos, sugerindo que a mesma possa exercer uma função relacionada à resposta imune e à atividade metabólica, ambas alteradas na esquizofrenia e no TB (Rothermundt *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2010; Leonard *et al.*, 2012).

3.1.2. Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é a subunidade protéica de filamentos intermediários do citoesqueleto das células da glia e está presente em uma série de tipos celulares do SNC, principalmente em astrócitos diferenciados (Rodnight *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 1999). Do ponto de vista estrutural, GFAP consiste em um polímero formado por uma região amino-terminal não helicoidal altamente básica, uma região carbóxi-terminal não-helicoidal responsável pela ligação entre monômeros e uma região central constituída por uma α -hélice cuja sequência de aminoácidos é conservada se comparada às demais proteínas de filamentos intermediários (Alberts *et al.*, 2002). A GFAP possui sítios específicos para fosforilação e tal mecanismo parece regular o equilíbrio dinâmico entre a sua forma polimerizada e a despolimerizada, exercendo importante papel na mitose (Rodnight *et al.*, 1997). Adicionalmente, outros fatores são capazes de influenciar o estado de polimerização (*in vitro*) deste tipo de proteínas como, por exemplo, o pH, a presença ou ausência de certos cátions, a força iônica do meio e a disponibilidade de ATP (Eng e Lee, 1995).

A glia radial e os astrócitos imaturos expressam principalmente vimentina (também uma proteína da família dos filamentos intermediários) no início do

desenvolvimento. Posteriormente, com o desenvolvimento glial *in vivo*, passa a ocorrer uma mudança na expressão dos genes de proteínas filamentosas intermediárias, e a vimentina passa a ser substituída progressivamente pela GFAP em astrócitos diferenciados ou maduros (Wofchuk e Rodnight, 1995). Desta maneira, no decorrer do desenvolvimento do SNC ocorre um aumento da expressão de GFAP, aumento este que também tem sido observado na gliose reativa, um evento caracterizado por alterações rápidas nas células gliais em decorrência de um dano ao tecido cerebral, como o aumento na expressão dos marcadores gliais GFAP e S100B (Gomes *et al.*, 1999; Baydas *et al.*, 2003).

Estudos utilizando ratos transgênicos indicam que a expressão de GFAP não é fundamental para a função e morfologia de grande parte dos astrócitos, mas é essencial no processo de astrogliose reativa e formação da cicatriz glial (Pekny *et al.*, 1995; Pekny e Pekna, 2004; Herrmann *et al.*, 2008). Existem distintas isoformas e variantes *splice* de GFAP, entre elas GFAP α , β , γ , δ , κ ; estas diferentes isoformas podem ser expressas de forma heterogênea no SNC saudável e em situações patológicas, como por exemplo glioma (Sofroniew *et al.*, 2010).

Pesquisas voltadas ao estudo de alterações astrogliais que possivelmente estejam implicadas na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos vêm sendo realizadas utilizando dados referentes à GFAP. Feresten e colaboradores (2013) observaram um aumento na expressão gênica de GFAP em pacientes com esquizofrenia e com TB quando comparados a controles saudáveis e em indivíduos com sintomas psicóticos em relação àqueles que não apresentavam sintomas desta natureza.

3.1.3. Glutamina Sintetase

A sinalização glutamatérgica é responsável pela formação e eliminação de sinapses, assim como atua na regulação da migração, diferenciação, sobrevivência e morte de células neurais (Komuro e Rakic, 1993; Durand *et al.*, 1996; Danbolt, 2001). Desta forma, o glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos, exercendo fundamental importância na cognição, memória e aprendizado (Fonnum, 1984; Collingridge e Lester, 1989; Headley e Grillner, 1990).

Entretanto, o glutamato, quando presente em níveis elevados durante um longo período de tempo no espaço extracelular, causa a ativação prolongada dos seus receptores, o que pode levar à morte celular devido a um processo denominado excitotoxicidade (Greenamyre *et al.*, 1988; Walton e Dodd, 2007), o qual está associado à fisiopatologia de várias doenças neurológicas, entre elas a epilepsia, esclerose múltipla, isquemia cerebral e doenças neurodegenerativas (Anderson e Swanson, 2000).

Os astrócitos são as principais células protetoras contra a excitotoxicidade, apresentando papel essencial na homeostase e metabolismo do glutamato (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Erecinska e Silver, 1990; Westergaard *et al.*, 1995). A captação astrocítica de glutamato, por meio de proteínas transportadoras, é quantitativamente a mais eficiente para manter normal a concentração extracelular deste neurotransmissor. Neurônios, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais também possuem transportadores de glutamato, porém o transporte realizado por estes tipos celulares é menos eficiente que o executado por astrócitos (Anderson e Swanson, 2000).

O glutamato captado pelos astrócitos é convertido a glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS), que atua catalisando a condensação ATP-dependente de amônia e glutamato para formar glutamina. A glutamina é então transportada novamente para os neurônios e convertida principalmente em glutamato (Walton e Dodd, 2007). A GS é uma enzima encontrada particularmente em astrócitos e exerce uma função crucial na homeostase do ciclo glutamato-glutamina e na detoxificação de amônia (Rose *et al.*, 2013), estando envolvida também no ciclo glutamato-GABA-glutamina (Eid *et al.*, 2013).

Há estudos que demonstram que citocinas (IL-1 e TNF-alfa, por exemplo) possuem ação inibitória sobre a GS (Huang e O'Banion, 1998). Sendo assim, postula-se que a neuroinflamação teria a capacidade de reduzir a atividade da GS (Eid *et al.*, 2013), o que explicaria, em parte, a possível relação entre inflamação e a excessiva neurotransmissão glutamatérgica característica de certas doenças neurológicas, especialmente a epilepsia.

3.2. Células da Microglia

As células da microglia constituem cerca de 10 % a 20 % do total da população celular glial presente no cérebro (Fu *et al.*, 2014) e são consideradas os “macrófagos cerebrais”, uma vez que são responsáveis principalmente pela fagocitose de microrganismos invasores e pela retirada de restos celulares.

A origem das células microgliais tem sido bastante discutida nas últimas décadas, o que gerou algumas teorias a respeito deste tema. No entanto, a teoria mais aceita na atualidade é a proposta por Ginhoux *et al.* (2010), a qual sugere que durante o desenvolvimento cerebral, este tipo celular origina-se a partir de progenitores hematopoiéticos (macrófagos primitivos) provenientes do saco vitelínico e que posteriormente tornam-se residentes no SNC de maneira independente da medula óssea. Sabe-se também que, uma vez estabelecidas no parênquima cerebral, as células da microglia passam a apresentar um alto potencial de auto-renovação e proliferação, processos estes que não dependem de precursores mielóides. Esta característica peculiar torna estas células distintas em relação aos macrófagos encontrados nas demais regiões do SNC (meninges, espaços perivasculares e plexo coroide), os quais provêm da medula óssea (Soulas *et al.*, 2009).

A microglia pode apresentar efeitos antagônicos dependendo do contexto e do estágio em que uma lesão ou doença se encontra. Desta maneira, estas células podem exercer um importante papel ativando vias relacionadas à neuroproteção, como por exemplo, estimulando o reparo do tecido que sofreu algum tipo de dano. Por outro lado, podem também levar à ativação de vias neurotóxicas, as quais muitas vezes conduzem a um quadro de neurodegeneração progressiva (Correale, 2014).

Estudos têm demonstrado que a microglia presente no SNC apresenta diferentes fenótipos/morfologias dependendo do estado no qual o tecido cerebral se encontra. Desta maneira, quando o SNC está livre de injúrias, o microambiente cerebral influencia a maturação dos precursores microgliais fazendo com que os mesmos desenvolvam uma morfologia ramificada e sejam classificados como microglia residente. Entretanto, a partir do momento em que o tecido cerebral sofre algum tipo de dano (lesão direta ou como consequência de uma doença), a microglia passa a apresentar um fenótipo ativado e sofre alterações morfológicas tais como hipertrofia do corpo celular com diminuição dos processos celulares e ramificação extensiva dos mesmos (Correale, 2014). No entanto, deve-se considerar que nem sempre alterações na morfologia implicarão em mudanças na função celular (Perry *et*

al., 2010; Beanroch *et al.*, 2013) apesar de que estudos demonstram também que as células microgliciais são células bastante plásticas e podem sofrer modificações em nível de expressão gênica e funcional (Hanisch *et al.*, 2007; Ransohoff e Cadorna, 2010).

A microglia também parece ser essencial no que diz respeito à plasticidade sináptica. Isto acontece porque na presença de condições patológicas, estas células conectam-se com as sinapses por um maior período de tempo do que quando há ausência de insultos ao tecido cerebral. Esta conexão mais prolongada com as sinapses pode levar à eliminação das mesmas em somas neuronais próximos, o que ocorreria como uma resposta ao estímulo inflamatório e sugere uma possível participação da microglia no processo inicial de poda sináptica (Kettenmann *et al.*, 2013), isto é, processo que visa eliminar as conexões sinápticas entre os neurônios.

Além disso, nos últimos anos tem-se buscado compreender uma possível relação entre microglia e a neuroinflamação. Neste sentido, um estudo conduzido por Weitz e Town (2012) revelou que células microgliciais ativadas secretam citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , as quais têm potencial para causar dano tanto aos neurônios quanto às células gliais. Alguns estudos *post-mortem* envolvendo pacientes psiquiátricos têm demonstrado alterações na concentração de marcadores de astrócitos e microglia, sugerindo um possível papel da neuroinflamação nestas patologias (Rhao *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos clínicos em pacientes com TB tem sugerido que estes indivíduos devem estar em um estado pró-inflamatório, já que alterações periféricas em algumas citocinas, tais como a IL-6 e a TNF- α , mostram-se alteradas em relação ao grupo controle (Stertz *et al.*, 2013). Diante destas evidências, é possível que a microglia exerça um importante papel relacionado à neuroinflamação, indicando que estas células possam também estar implicadas na fisiopatologia do TB (Stertz *et al.*, 2013).

3.2.1. Iba1: Marcador de Microglia Ativada

Iba1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*) é uma proteína ligadora de cálcio relativamente pequena: apresenta cerca de 20 kDa e é formada por 147 aminoácidos (Ito *et al.*, 1998). Em cultivo de células cerebrais, observou-se que a expressão de mRNA de Iba1 é específica da microglia, sem evidências de ser

expressa em astrócitos, neurônios ou oligodendrócitos (Ito *et al.*, 1998). Adicionalmente, em um estudo com cérebros de ratos pós-natal, realizado por Imai e Kohsaka (2002), observou-se que o anticorpo anti-Iba1 reagia fortemente com as células microgliais, as quais apresentavam um formato mais ameboide, característico de microglia imatura ou ativa.

Do ponto de vista funcional, atualmente sabe-se que Iba1 é uma molécula essencial para a ativação da microglia, sendo também responsável por regular a reorganização de citoesqueleto de actina, importante para os eventos celulares que resulta em ativação da microglia, como por exemplo, durante a proliferação, migração, fagocitose e produção de agentes bioativos que poderão atuar sobre outros elementos celulares (Imai e Kohsaka, 2002).

3.3. Astrogliose e Microgliose

Pesquisas recentes indicam que processos neuropatológicos em seus estágios iniciais estão associados à ativação de vias inflamatórias similares, as quais envolvem a ativação de astrócitos e da microglia, além da liberação de mediadores inflamatórios responsáveis também pela regulação da proliferação e hipertrofia de astrócitos. Evidências destes processos de caráter neuroinflamatório têm sido encontradas em uma série de transtornos neurológicos, tais como dano à medula espinal, isquemia, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral, esclerose múltipla, doença de Huntington e transtornos psiquiátricos (Okada *et al.*, 2006; Glass *et al.*, 2010; Verkhratsky *et al.*, 2013, Colangelo *et al.*, 2014).

A resposta dos astrócitos a distintas formas de dano ou patologias no SNC é denominada astrogliose (Sofroniew e Vinters, 2010). Porém, as células da microglia são as primeiras a serem ativadas frente a um insulto ao SNC, o que constitui uma hiperatividade microglial generalizada, uma condição conhecida como microgliose. Uma vez ativadas, estas células rapidamente migram para o local da lesão, dando início as demais reações gliais e comunicação com o sistema imune (Hanisch e Kettenmann, 2007).

Sabe-se hoje que a astrogliose reativa não consiste simplesmente em um fenômeno de tudo ou nada, mas sim em um evento que pode ser caracterizado por mudanças que variam desde alterações reversíveis na expressão gênica e hipertrofia

celular até a formação de cicatriz glial, com permanente rearranjo do tecido nervoso. Esta variedade de mudanças estruturais e funcionais relacionadas à astrogliose reativa são reguladas por distintos eventos de sinalização e tem revelado vários níveis de heterogeneidade entre astrócitos reativos (Sofroniew, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010).

Recentemente, uma definição geral para astrogliose reativa tem sido proposta por Sofroniew (2009), tendo como base um grande número de observações em experimentos animais. Segundo o autor, a definição de astrogliose reativa deveria incluir quatro características essenciais: 1) A astrogliose reativa envolve um espectro de mudanças moleculares, celulares e funcionais em astrócitos, e ocorre em resposta a todas as formas e graus de severidade de dano ao SNC e doenças; 2) As mudanças sofridas pelos astrócitos variam de acordo com a gravidade do insulto; 3) As alterações da astrogliose reativa são reguladas de maneira específica por moléculas de sinalização intra e extracelulares; 4) As mudanças que ocorrem durante a astrogliose reativa têm o potencial de alterar as atividades dos astrócitos tanto por ganho como por perda de funções (Sofroniew, 2009; Anderson *et al.*, 2014).

Em suma, o termo astrogliose reativa consiste no fato de que em estágios iniciais de uma patologia ou de um dano ao SNC, os astrócitos reativos são necessários para limitar a extensão do dano tecidual, incluindo a formação de uma cicatriz glial. Por outro lado, quando a astrogliose reativa persiste ao longo do tempo, ela passa a ser prejudicial ao SNC (Robel *et al.*, 2011).

Por fim, o envolvimento dos astrócitos e da microglia na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos, em especial no TB, advém de recentes estudos realizados por Rao *et al.* (2010). Ao analisar o córtex pré-frontal *post mortem* de pacientes com TB, os autores encontraram um aumento significativo na expressão de GFAP e no nível de mRNA de CD11b (um marcador de astrócitos e ativação microglial). Além disto, estudos envolvendo tecido *post mortem* de pacientes com depressão maior também apontam para um aumento significativo na densidade glial no hipocampo destes indivíduos (Stockmeier *et al.*, 2004).

4. Justificativa

Pacientes com TB apresentam disfunções cognitivas e funcionais, além de alterações em vias neurotróficas e inflamatórias. Tendo em vista que disfunções neurocognitivas no TB parecem estar associadas com alterações neuroanatômicas e em células gliais, nosso estudo visou investigar possíveis alterações destas células no estriado em um modelo animal de mania.

Trabalho Experimental na Forma de Artigo Científico

**Identificação de padrões gliais no estriado em um modelo animal de mania: um
estudo piloto**

Giovana Bristot, Bianca Pfaffenseller, Laura Stertz, Silvia Olivera-Bravo, Luis
Barbeito, Flávio Kapczinski, Adriane Ribeiro Rosa

Trabalho em preparação a ser submetido para o periódico:

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Resumo

Estudos recentes sugerem o envolvimento de alterações em células gliais na fisiopatologia do transtorno bipolar e de outras doenças psiquiátricas como esquizofrenia e depressão maior. Sabe-se que astrócitos e microglia exercem funções essenciais no sistema nervoso central, estando envolvidos principalmente na manutenção da homeostase e promoção de um ambiente celular adequado. No entanto, quando ativadas, estas células podem exercer efeito negativo sobre os eventos tróficos em vias neuronais lesadas. Desta maneira, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar possíveis alterações em astrócitos e em células microgлияis no estriado de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina (LDX). O experimento foi realizado em um modelo no qual ratos Wistar machos (n = 16) receberam por via oral diariamente, ao longo de sete dias, LDX 10 mg/kg (n = 8) – grupo LDX, ou água destilada (n = 8) – grupo controle; no oitavo dia os ratos receberam uma última administração de LDX ou água destilada e em seguida cada grupo foi dividido em quatro subgrupos, os quais foram submetidos à eutanásia em momentos distintos - 2 horas, 24 horas, 15 dias e 21 dias após a última administração. Os animais foram perfundidos com salina 0,9 % seguido por perfusão com paraformaldeído (PFA) 10 % em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4. Após a eutanásia, os cérebros dos ratos foram removidos e pós-fixados com PFA 10 % (24 h, 4 °C) e permaneceram em tampão fosfato até a separação do estriado e posterior secção da estrutura (secções com aproximadamente 50 µm de espessura) usando um vibrátomo. Em seguida, foi realizada imuno-histoquímica usando anticorpos primários com o objetivo de avaliar os marcadores de astrócitos GFAP (proteína ácida fibrilar glial), S100B e GS (glutamina sintetase) e o marcador de microglia Iba1, além de anticorpos secundários apropriados conjugados a fluorocromos. As imunomarcações foram visualizadas por meio de microscopia confocal. Neste estudo, cujos resultados ainda são preliminares devido ao limitado número de animais utilizados até o momento, observamos que houve um aumento no número de células positivas para os marcadores de astrócitos S100B, GFAP e GS nos animais tratados com LDX em relação ao grupo controle na maioria das condições experimentais investigadas. Adicionalmente, notamos também um aumento na quantidade de células Iba1+ no grupo LDX quando comparado ao grupo controle, nas condições referentes a 2 horas e 24 horas, o que representa um incremento no número de células microgлияis ativadas. Embora ainda não seja possível avaliar se estas diferenças são estatisticamente significativas, a interpretação conjunta dos dados obtidos nos permite sugerir que possa estar ocorrendo microglioze e astroglioze reativas nos animais que receberam LDX, o que reforçaria a hipótese de que a microglia poderia estar levando à ativação de astrócitos por meio de mediadores inflamatórios, o que iria ao encontro de estudos recentes que mostram a presença de um estado pró-inflamatório durante episódios agudos no transtorno bipolar. Contudo, mais estudos são necessários para que seja possível garantir um poder estatístico adequado ao trabalho e assim comprovar os dados obtidos até o momento.

1. Introdução

O transtorno bipolar (TB) é uma doença mental grave de caráter crônico e com alto índice de recorrência, caracterizada por oscilações de humor que podem variar em intensidade, duração e frequência (Goodwin e Jamison, 1991). Atualmente, o TB é considerado uma das dez condições mais incapacitantes, sendo que pacientes bipolares frequentemente apresentam déficits cognitivos relacionados à memória e ao aprendizado, fator este que influencia de forma direta no funcionamento psicossocial destes indivíduos (Kilbourne *et al.*, 2009). Recentes avanços têm mostrado o envolvimento de certas neurotrofinas (Cunha *et al.*, 2006; de Oliveira *et al.*, 2009), marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo (Berk *et al.*, 2011; Kapczinski *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2011) na fisiopatologia do TB.

Em particular, pacientes bipolares durante os episódios agudos da doença mostraram um aumento dos níveis periféricos de citocinas pró-inflamatórias, especificamente de IL-6 e TNF- α , durante os episódios depressivos e aumento de IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α durante a mania quando comparados aos eufímicos e controles saudáveis (Ortiz-Domínguez, *et al.*, 2007; Brietzke *et al.*, 2009). Além disso, tais alterações tem sido mais proeminentes durante os estágios mais avançados da doença (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2009) assim como em pacientes com maiores taxas de comorbidades (Leboyer *et al.*, 2012).

Neurônios e células gliais são os componentes básicos do sistema nervoso central (SNC), sendo que as últimas subdividem-se em microglia e macroglia. As células da microglia são essenciais para a defesa imune do SNC e geralmente são recrutadas após lesões, infecções ou doenças neurodegenerativas do sistema nervoso. Uma vez que a microglia é ativada no sítio da lesão, a mesma passa a sofrer alterações morfológicas e torna-se hábil para proliferar e realizar fagocitose (Gomes *et al.*, 2013). Desta maneira, quando o SNC está livre de injúrias, a microglia apresenta uma morfologia ramificada e é classificada como microglia residente, enquanto que durante um dano cerebral (lesão direta ou como consequência de uma doença), esta microglia passa a apresentar alterações morfológicas como, por exemplo, hipertrofia do corpo celular (Correale, 2014) e um fenótipo ativado, com um aumento da expressão de Iba-1 (Imai e Kohsaka, 2002).

A microglia também está relacionada à plasticidade sináptica e muitas vezes, quando ativada, pode levar à eliminação de sinapses, o que ocorre como uma resposta ao estímulo inflamatório e sugere uma possível participação destas células no processo inicial de poda sináptica (Kettenmann *et al.*, 2013). Um estudo conduzido por Weitz e Town (2012) revelou que células microgliais ativadas secretam as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , as quais têm potencial para causar danos tanto aos neurônios quanto às células gliais. Adicionalmente, um conjunto crescente de evidências tem sugerido que as citocinas liberadas pela microglia ativada devem contribuir para o desenvolvimento de astrogliose reativa no SNC. O processo de astrogliose reativa caracteriza-se pela proliferação e hipertrofia de astrócitos com aumento da expressão de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) e S100B (Gomes *et al.*, 1999; Baydas *et al.*, 2003) e de glutamina sintetase (GS), particularmente encontrada nos astrócitos (Rose *et al.*, 2013). Os astrócitos reativos também são necessários para limitar a extensão do dano tecidual, incluindo a formação de cicatriz glial, especialmente durante os estágios iniciais da lesão. Por outro lado, quando a astrogliose reativa persiste ao longo do tempo, ela passa a ser prejudicial ao SNC (Robel *et al.*, 2011).

Estudos *post-mortem* realizados em pacientes com transtornos psiquiátricos relataram a presença de alterações em marcadores astrocitários e microgliais no córtex pré-frontal (Rao *et al.*, 2010). Os resultados destes estudos evidenciaram um aumento significativo na expressão protéica de GFAP e de mRNA de CD11b (um marcador de astrócitos e ativação microglial). Somado a isto, estudos clínicos apontam que pacientes bipolares se encontrariam em um estado pró-inflamatório dada as alterações dos marcadores inflamatórios reportados acima (Berk *et al.*, 2011; Kapczinski *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2011). Embora algumas evidências sugiram uma possível relação entre o processo inflamatório e a fisiopatologia do TB, o exato papel da microglia e dos astrócitos neste processo não está claramente compreendido.

O presente estudo tem como objetivo principal investigar possíveis alterações na microglia e astrócitos em um modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Os experimentos foram realizados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizando ratos Wistar adolescentes, machos, com idade de aproximadamente 30 dias e pesando entre 80 g e 120 g. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22 °C) com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes entre 7:00 a.m. e 7:00 p.m.), com água e alimentação padrão livre. Um total de 16 animais foi dividido em dois grupos de tratamento, sendo que a separação foi realizada de maneira randômica. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as recomendações de cuidados com animais do *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH, 1996) e da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e seguiram a RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

2.2. Tratamento

Inicialmente, os animais receberam diariamente ao longo de sete dias água destilada (Grupo Controle, n=8) ou dimesilato de lisdexanfetamina (LDX) (10 mg/Kg, n=8) via oral (gavagem com um volume de 10 mL/Kg) para reproduzir o modelo animal de mania anteriormente proposto (Macêdo *et al.*, 2013). No oitavo dia, os ratos receberam uma última administração de água destilada ou LDX (10 mg/Kg) e cada grupo de tratamento foi subdividido em 4 subgrupos, os quais foram então submetidos à eutanásia em diferentes tempos após a última administração do tratamento: 2 horas (P38), 24 horas (P39), 15 dias (P53) e 21 dias (P59).

2.3. Eutanásia

O procedimento foi realizado seguindo padrões previamente estabelecidos por Olivera-Bravo e colaboradores (2011). Brevemente, 2 animais de cada condição experimental foram anestesiados com cetamina:xilazina (90:10 mg/kg) e perfundidos intracardiacamente com salina 0,9% (5 mL/min, durante 20 minutos) e em seguida com paraformaldeído (PAF) 10% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 (5 mL/min por 40 minutos). Após a perfusão, os animais foram rapidamente decapitados para remoção do cérebro. Os cérebros foram então pós-fixados (24 h, 4 °C) e mantidos em

tampão fosfato até a secção. Posteriormente, séries de 50 µm de espessura de cada cérebro contendo regiões do estriado foram obtidas com um vibrátomo, e armazenadas a 4 °C (cortes soltos em solução - *free-floating*).

2.4. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada no Instituto Pasteur de Montevideo pelo método *free-floating*, no qual as secções de tecido são permeabilizadas com Triton X-100 (0,1 % em PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavagens com soluções tamponadas, bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) (5 % em PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente, e incubação *overnight* a 4 °C em uma solução de PBS com 0,1% de Triton X-100 e os anticorpos primários referentes aos seguintes antígenos: GFAP (Sigma G9269, 1:500), S100B (Sigma S2532, 1:600) e GS (Abcam Ab49873, 1:6000) para o reconhecimento de astrócitos; e Iba1 (Abcam Ab108539, 1:200) para o reconhecimento de microglia. Após lavagens, as secções foram incubadas com os anticorpos secundários (diluídos 1:1000) conjugados com Alexa Fluor 488 e/ou Alexa Fluor 546 (Invitrogen). As imagens contendo as imunomarcações foram obtidas por microscopia confocal (Leica TCS SP5 II e Olympus FV300) utilizando uma objetiva de 40x, sendo que as marcações referentes a S100B e Iba1 foram adquiridas usando a linha de laser 488 nm de um laser de argônio, e para GFAP e GS foi usada a linha de laser 559 nm.

2.5. Análise quantitativa de células positivas para S100B, GFAP, GS e Iba1

Em relação aos marcadores astrocitários, foram contadas as células marcadas positivamente para S100B, GFAP e GS. Em relação à marcação para S100B, foram adquiridas fotos referentes a dois animais de cada grupo (LDX e Controle) para cada condição experimental (2 horas, 24 horas, 15 dias e 21 dias), o que totalizou 12 imagens para cada condição (por animal). Para GFAP, seguiu-se o mesmo procedimento, sendo adquiridas em média 10 imagens para cada condição (por animal – com exceção da condição 24 h, na qual somente foi possível realizar a análise referente a um animal). Para GS foram obtidas fotos relativas a um único animal por grupo devido a questões metodológicas, totalizando uma média de 10 imagens para cada condição.

Do mesmo modo, a fim de obter o número de células positivas para o marcador de microglia Iba1, foram adquiridas 18 fotos para cada condição experimental (2 horas, 24 horas, 15 dias e 21 dias) relativas aos grupos controle e LDX (um animal por grupo).

Para analisar o número de células positivas para os marcadores astrocitários S100B, GFAP e GS e para o marcador de microglia Iba1 foi utilizado o software ImageJ. Um plugin deste programa permite realizar a contagem de células por meio de cliques nas imagens de cada célula. Quando a contagem é finalizada, tem-se o dado relativo ao número total de células neste painel.

Ao final das contagens, obteve-se um dado referente à quantidade de células positivas para S100B, outro relativo à GFAP, um terceiro referente à GS; e um último referente às células Iba1 positivas. A fim de manter um padrão para a posterior análise dos resultados, os dados foram expressos em função da área de tecido estriatal analisada: número de células positivas (para cada marcador de astrócitos ou de microglia) por milímetro quadrado de tecido.

3. Resultados

Nas análises referentes às células positivas para S100B (n=2 animais), foi observada uma diferença no número de células S100B+ por milímetro quadrado (nº de células/mm²) no estriado entre o grupo controle e o grupo LDX em todas as condições experimentais (2 horas, 24 horas, 15 dias e 21 dias). Nota-se também que esta diferença é um pouco maior nas condições iniciais (2 horas e 24 horas) em relação às condições mais tardias (15 dias e 21 dias) (Figura 1a e Figura 2).

Em relação às células positivas para GFAP (n=2 animais para 2 horas, 15 dias e 21 dias; n=1 para 24 horas), foi observada uma diferença no nº de células GFAP+ /mm² no estriado dos animais do grupo controle relativo aos do grupo LDX, nas distintas condições experimentais. Entretanto, para este marcador de astrócitos, em 2 h foi observado um aumento no número de células positivas no grupo controle quando comparado ao grupo LDX, ao passo que nas demais condições (24 h, 15 d e 21 d) o efeito foi o oposto, ou seja, um maior número de células GFAP+ foi visto no grupo LDX em relação ao grupo controle (Figura 1b e Figura 3).

Considerando o marcador astrocitário GS (n=1 animal), verificou-se um maior número de células GS+/mm² no grupo LDX em comparação ao grupo controle nas condições que foram passíveis de análise – 2 h, 15 d e 21 d (Figura 1c e Figura 4).

Por fim, nas análises relativas ao número de células positivas para o marcador de microglia Iba1 (n= 1 animal), também foram constatadas diferenças no número de células Iba1+/mm² entre os dois grupos, sendo que nas condições iniciais (2 h e 24 h) há um maior número de células Iba1+/mm² no grupo LDX quando comparado ao grupo controle. Em contrapartida, uma diferença sutil entre os grupos LDX e controle foi observada nas condições mais tardias, porém com um maior número de células Iba1+/mm² no grupo controle em relação ao LDX (Figura 1d e Figura 5).

Como este é um experimento piloto que inclui um número muito limitado de animais, não foi possível estabelecer se as diferenças entre os grupos, acima relatadas, foram significativas. Os resultados são preliminares, visto que estas análises quantitativas ainda serão finalizadas.

4. Discussão

Neste trabalho foi possível verificar a presença de alterações gliais, tanto em células microgлияis como em astrócitos, no estriado de ratos tratados com LDX. Apesar de tratar-se de um estudo piloto conduzido com um pequeno número de animais, com resultados preliminares até o momento, podemos sugerir que existe uma tendência para o aparecimento de microgliose e astrogliose naqueles animais tratados com LDX.

Em particular, observamos um leve aumento no número de células positivas para o marcador astrogliar S100B no grupo LDX em relação ao grupo controle nos diferentes tempos. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados por Machado-Vieira *et al.* (2002), Andreazza *et al.*, (2007) e Schroeter *et al.* (2013), nos quais observaram-se um aumento significativo dos níveis séricos de S100B em pacientes bipolares durante os episódios maníacos e depressivos. Juntos, estes achados poderiam sugerir que a elevação de S100B extracelular deve ocorrer devido a um aumento da atividade astrocitária, podendo contribuir para a exacerbação da neuroinflamação e disfunção neuronal (Van Eldik e Wainwright, 2003).

Em relação à GFAP, também se observou um incremento de células positivas para esta imunomarcação no grupo LDX em relação ao grupo controle durante as 24 horas, 15 dias e 21 dias após a última administração. Os mesmos resultados foram observados para a imunomarcação relativa à glutamina sintetase. Neste sentido, Eid *et al.* (2013) postulam que a neuroinflamação teria a capacidade de reduzir a atividade da GS. Similarmente, Huang e O'Banion (1998) sugerem que as citocinas IL-1 e TNF- α , por exemplo, possuem ação inibitória sobre a GS. Estes dados são contrários ao aumento em GS observados em nosso trabalho. Entretanto, nós avaliamos unicamente o imunoconteúdo e não a atividade da enzima em questão. É possível que haja uma redução da atividade de GS nos astrócitos, o que resultaria em uma maior dificuldade na reciclagem do glutamato, ocasionando maior permanência deste neurotransmissor na fenda sináptica e, conseqüentemente levando à excitotoxicidade.

Pesquisas recentes relataram a presença de alterações microgliais e astrocíticas em transtornos mentais; em um estudo conduzido por Rao e colaboradores (2010) foi realizada a análise de córtex pré-frontal *post mortem* de pacientes com transtorno bipolar, sendo encontrado um aumento significativo na expressão de GFAP e no nível de CD11b (marcador de ativação microglial). Outro estudo, também realizado com tecido *post mortem* de pacientes com depressão maior mostrou um aumento significativo na densidade glial no hipocampo destes indivíduos (Stockmeier *et al.*, 2004). Além disso, pacientes esquizofrênicos com neuroinflamação tiveram um aumento na expressão de GFAP (mRNA) e apresentaram astrócitos hipertróficos, além de elevada expressão de transcritos (mRNA) associados à astrogliose (Catts *et al.*, 2014). Nossos resultados, ainda que preliminares, parecem estar na mesma linha dos estudos acima citados, enfatizando o possível envolvimento da neuroinflamação na fisiopatologia do TB.

No presente trabalho, encontramos um possível aumento da ativação microglial no grupo LDX, representado pelo número de células positivas para Iba1 nas condições iniciais (2 horas e 24 horas), sendo que este aumento deixou de ser observado nas condições tardias (15 dias e 21 dias). A hipótese para explicar este achado consiste na ideia de que a administração de LDX estaria levando a uma ativação microglial inicial, ou seja, durante a administração do referido composto parece existir uma ativação das células microgliais. No entanto, no momento que

LDX deixa de ser administrada aos animais, é provável que este estímulo responsável por tal ativação cesse depois de um tempo, possibilitando que o tecido cerebral se recupere e que a ativação microglial diminua.

Desta maneira, unindo os dados relativos a astrócitos e a microglia descritos neste trabalho, é possível sugerir que neste modelo animal de mania ocorra uma gliose reativa. Este processo é considerado uma resposta inflamatória caracterizada pela proliferação de células microgliais e de astrócitos, e às vezes também observada uma hipertrofia de astrócitos (Zhang *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013). Sendo assim, quando ocorrem respostas inflamatórias de maneira repetida e sustentada, como em situações em que há a ocorrência de insultos severos ou prolongados ao SNC (por exemplo, a toxicidade dos episódios de humor), poderia ser gerado um *feedback* positivo entre astrócitos e microglia, levando ao aparecimento de sinais que podem comprometer as funções tanto dos astrócitos como dos neurônios e culminar em uma neuroinflamação de caráter crônico (Glass *et al.*, 2010; Sofroniew e Vinters, 2010).

O presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas ao interpretar os resultados. Primeiro, o número de animais é particularmente pequeno, e a falta de variabilidade amostral impossibilita uma análise estatística dos dados. Segundo, o uso de modelos animais em psiquiatria apresenta algumas limitações, dada a dificuldade de mimetizar nos animais algumas características particulares do TB, como podem ser o fenômeno da recorrência e o caráter cíclico da mesma (Kapczinski *et al.*, 2009). Além disso, também devemos ter cautela no momento de transpor os dados obtidos a partir destes modelos para os seres humanos. Não obstante, os modelos animais para TB são uma ferramenta pré-clínica essencial no que diz respeito à compreensão da fisiopatologia da doença e ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Lipska e Weinberger, 2000). Futuros estudos são necessários, com um maior número de animais, para confirmar os resultados acima encontrados.

Em suma, apesar de preliminares, os resultados do presente estudo-piloto sugerem a ocorrência de microgliose e astrogliose no estriado de animais tratados com LDX. Provavelmente, isto nos indica uma possível relação entre neuroinflamação e a fisiopatologia do TB. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar os resultados demonstrados neste trabalho e auxiliar na compreensão

de possíveis vias celulares e/ou moleculares que possam estar envolvidas com a doença.

Referências

Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, et al. Serum S100B and antioxidante enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res*, 2007 Sep; 41: 523-9.

Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *European journal of pharmacology*. 2003 Feb; 462: 67-71.5.

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2011 Jan; 35: 804-17.

Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy Vargas A, et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *Journal of affective disorders*. 2009 Aug; 116: 214-7.

Catts VS, Wong J, Fillman SG, et al. Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: Association with neuroinflammation. *Aust N Z J Psychiatry*. 2014 Apr.

Correale J. The role of microglial activation in disease progression. *Multiple sclerosis*. 2014 May.

Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, et al. Serum-brain derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and maniac episodes. *Neurosci Lett*, 2006 May; 398: 215-9.

de Oliveira GS, Cereser KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *Journal of psychiatric research*. 2009 Sep; 43: 1171-4.

Eid T, Tu N, Lee TS, Lai JC. Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy. *Neurochemistry international*. 2013 Dec; 63: 670-81.

Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, Cai J. Reciprocal Modulation Between Microglia and Astrocyte in Reactive Gliosis Following the CNS Injury. *Molecular neurobiology*. 2013 Dec; 48: 690-701.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*. 2010 Mar; 140: 918–934.

Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica*. 1999 May; 32: 619-31.

Gomes FC, Tortelli VP, Diniz L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estudos avançados* 27. 2013; 61-84.

Goodwin FK e Jamison KR. Manic-depressive illness. *Psychological medicine*. 1991 Aug; 21: 803-803.

Huang TL, O'Banion MK. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α suppress dexamethasone induction of glutamine synthetase in primary mouse astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 1998 Oct; 71: 1436-42.

Imai Y e Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia*. 2002 Nov; 40: 164-74.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal of psychiatric research*. 2011 Feb; 45: 156-61.37.

Kapczinski F, Quevedo J, Rosa A.R, et al. Transtorno Bipolar: Teoria e Clínica. 1ª Ed. Porto Alegre, Artmed, 2009. Cap. 3: Modelos animais do transtorno bipolar; 44-60.

Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *The international journal of*

neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP). 2009 May; 12: 447-58.

Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013 Jan; 77: 10-8.

Kilbourne AM, Perron BE, Mezuk B, Welsh D, Ilgen M, Bauer MS. Co-occurring conditions and health-related quality of life in patients with bipolar disorder. *Psychosomatic medicine*. 2009 Oct; 71: 894-900.

Leboyer M, Soreca I, Scott J, et al. Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease? *J Affect Disord*, 2012 Dec; 141:1-10.

Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 2000; 23: 223–39.

Macedo DS, de Lucena DF, Queiroz AI, Cordeiro RC, Araujo MM et al. Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate: relevance as an animal model of mania. *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry*. 2013 Jun; 43: 230-7.

Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Goncalves CA, Soares JC, Kapczinski F, et al. Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002 Jun; 12: 269-72.

Magalhaes PV, Jansen K, Pinheiro RT, Klamt F, Teixeira AL, da Silva RA, et al. Systemic toxicity in early-stage mood disorders. *Journal of psychiatric research*. 2011 Oct; 45: 1407-9.

NIH. Guide for the care and use of laboratory animals — Institute of Laboratory Animal Research — National Research Council. National Academies Press; 1996.

Olivera-Bravo S, Fernandez A, Sarlabos MN, Rosillo JC, Casanova G, Jimenez M, Barbeito L. Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal. *PLoS One*. 2011; 6: e20831.

Ortiz-Domínguez A, Hernández ME, Berlanga C, et al. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord*, 2007 Sep; 9: 596-602.

Rao JS, Harry GJ, Rapoport SI, Kim HW. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. *Molecular psychiatry*. 2010 Apr; 15: 384-92.

Robel S, Berninger B, Gotz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nature reviews*. 2011 Feb; 12: 88-104.

Rose CF, Verkhratsky A, Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochemical Society transactions*. 2013 Dec; 41: 1518-24.

Schroeter ML, Sacher J, Steiner J, Schoenknecht P, Mueller K. Serum S100B represents a new biomarker for mood disorders. *Current drug targets*. 2013 Oct; 14: 1237-48.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan; 119: 7-35.

Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, et al. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biological psychiatry*. 2004 Nov; 56: 640-50.

Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative neurology and neuroscience*. 2003; 21: 97-108.

Weitz TM e Town T. Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *Int J Alzheimers Dis*. 2012; 2012: 314185.

Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong JS. Astroglial gliosis in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia? *Mol Neurobiol*. 2010 Jun; 41: 232–241.

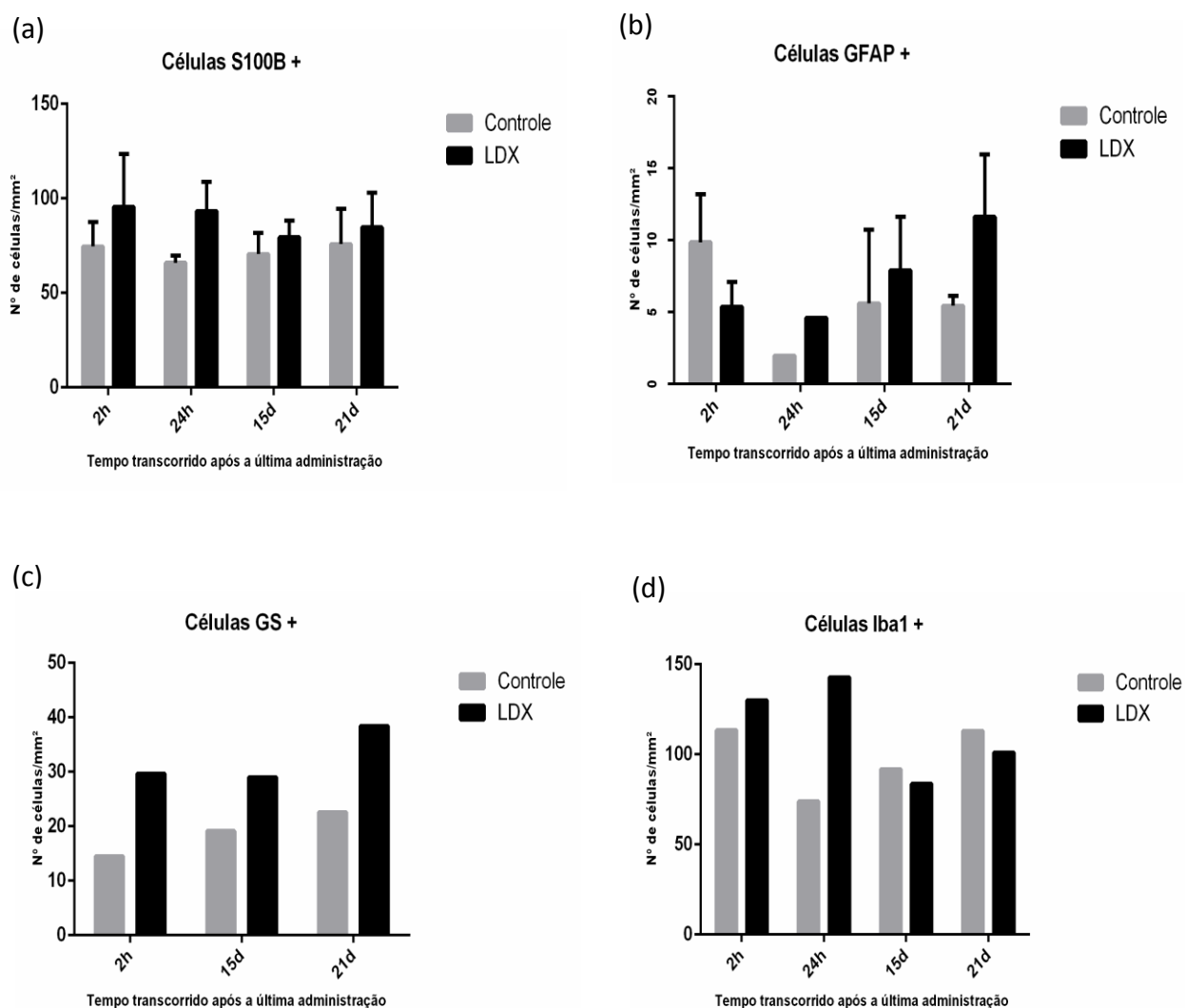


Figura 1: Análise de parâmetros gliais no estriado de ratos Wistar em um modelo animal de mania induzido por dimesilato de lisdexanfetamina (LDX). As representações gráficas referem-se à média do número de células positivas para cada marcador glial/mm² (\pm desvio padrão) de área estriatal nos grupos controle e LDX nas diferentes condições experimentais – 2 horas, 24 horas, 15 dias e 21 dias. (a) Gráfico relativo a células S100B+ (n=2 animais por condição). (b) Gráfico representativo de células GFAP+ (n= 2 animais por condição, exceto em 24 h na qual n=1). (c) Gráfico referente a células GS+ (n= 1 animal por condição). (d) Gráfico correspondente ao número de células Iba1+ (n= 1 animal por condição).

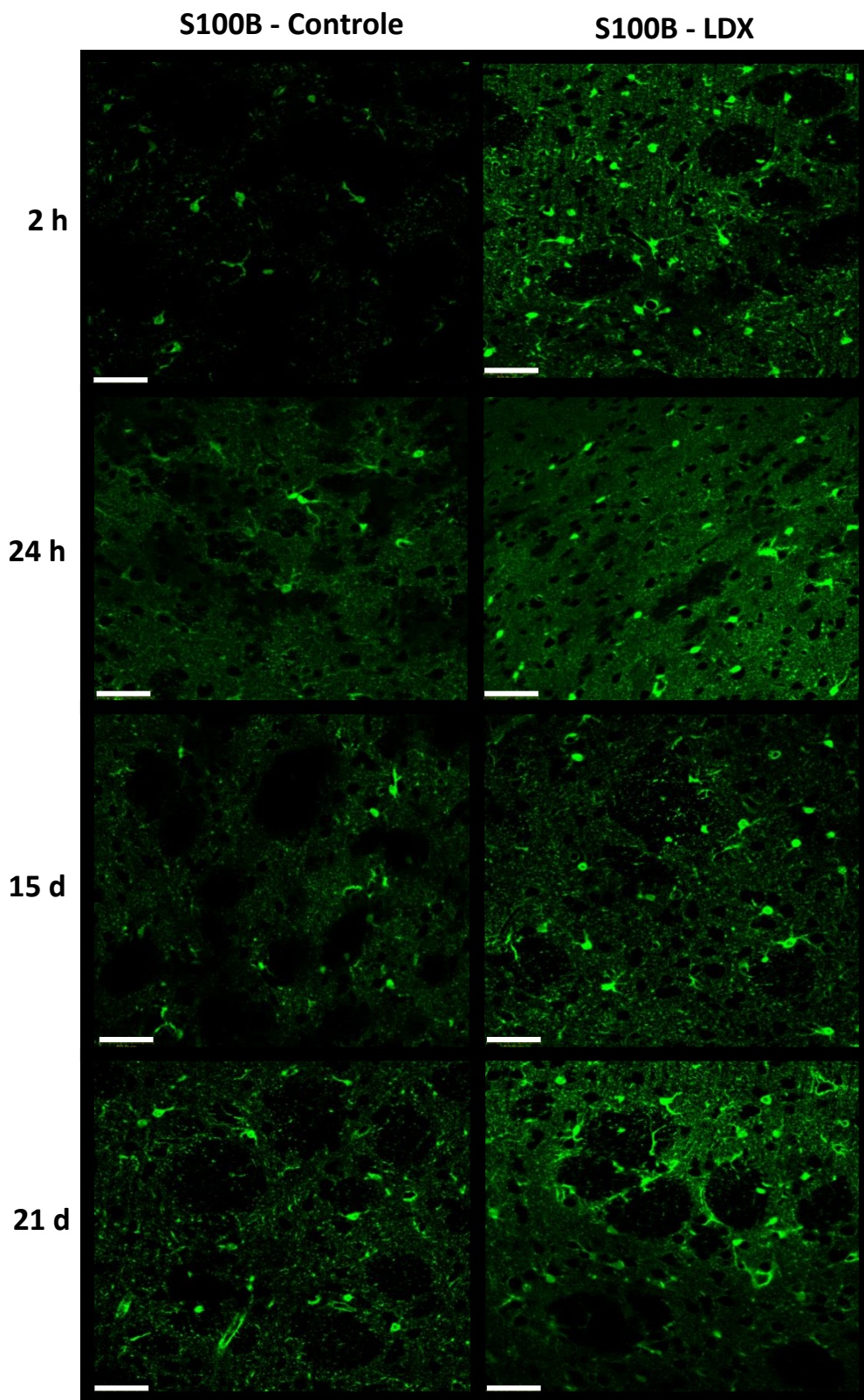


Figura 2: Imagens representativas de astrócitos S100B+ no estriado de ratos dos grupos controle e LDX nas distintas condições experimentais (2 h, 24 h, 15 d e 21 d). Barra de escala = 50 μ m.

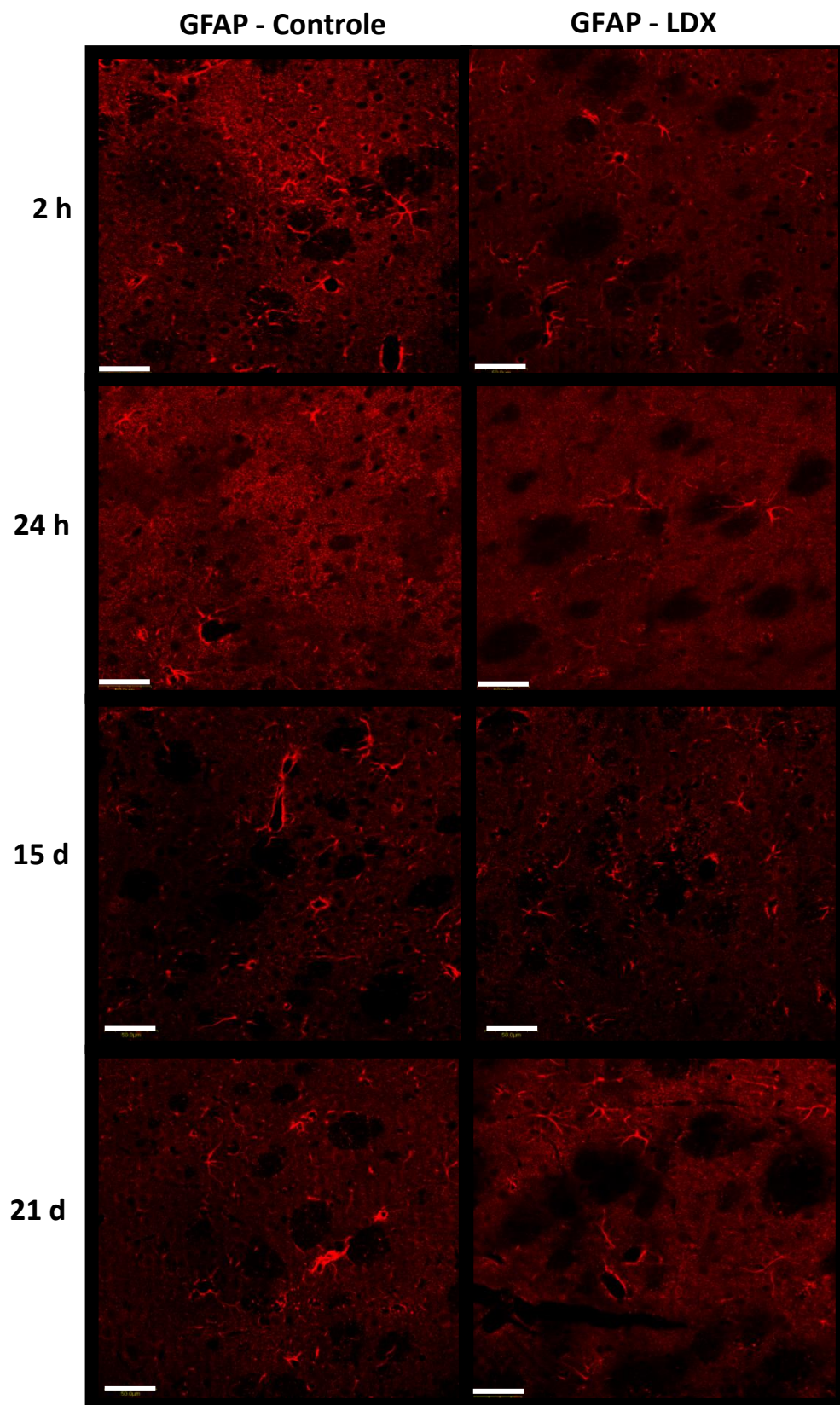


Figura 3: Imagens representativas de astrócitos GFAP+ no estriado de ratos dos grupos controle e LDX nas diferentes condições experimentais (2 h, 24 h, 15 d e 21 d). Barra de escala = 50 μ m.

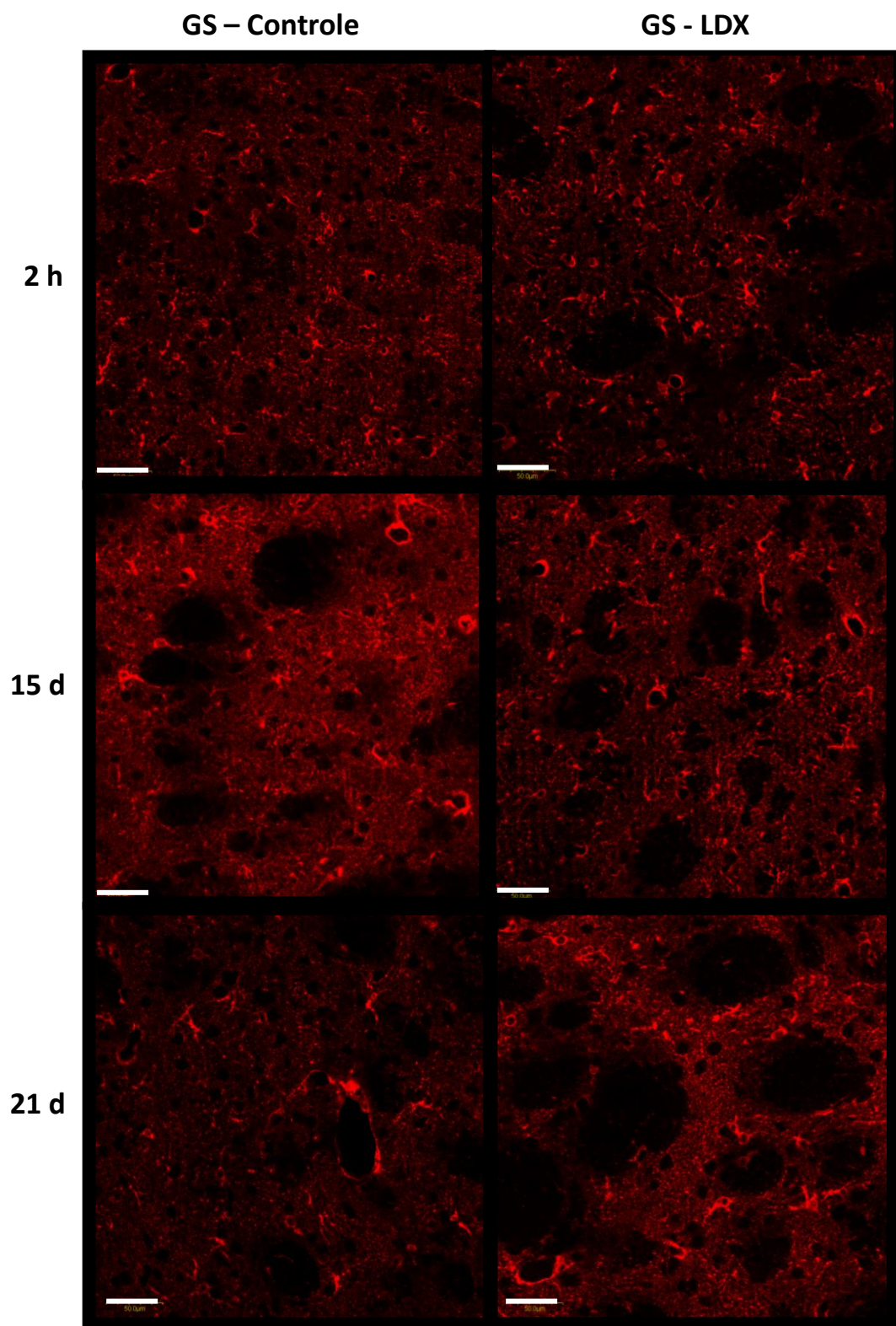


Figura 4: Imagens representativas de astrócitos GS+ no estriado de ratos pertencentes aos grupos controle e LDX nas distintas condições experimentais (2 h, 15 d e 21 d). Barra de escala = 50 μ m.

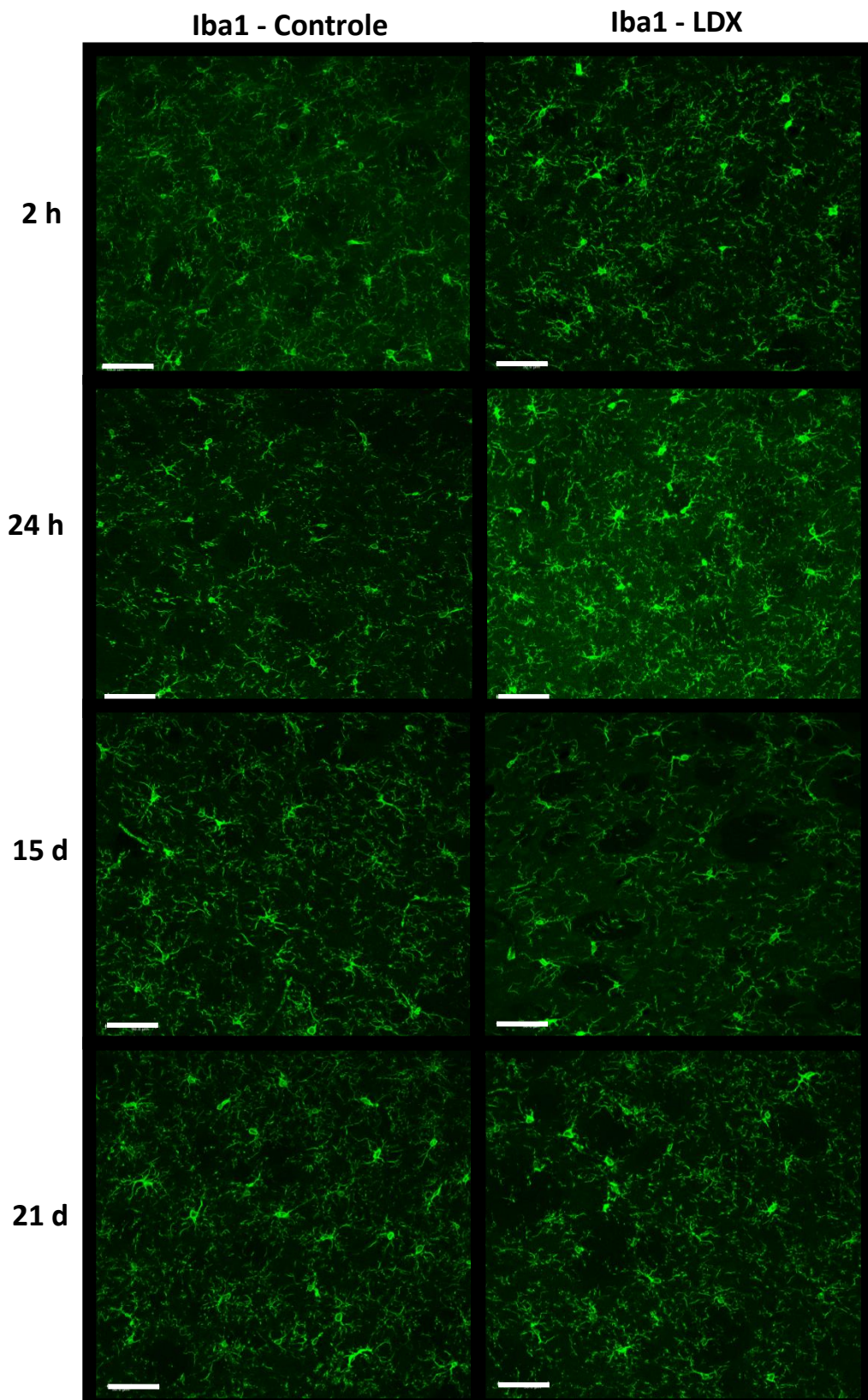


Figura 5: Imagens representativas de células microgliais Iba1+ localizadas no estriado de ratos dos grupos controle e LDX nas diferentes condições experimentais (2 h, 24 h, 15 d e 21 d). Barra de escala = 50 μ m.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Apesar de preliminar, os resultados deste estudo mostram um aumento no número de células positivas para o marcador de microglia ativada Iba1 e para os marcadores de astrócitos S100B, GFAP e GS nos ratos tratados com LDX. Isto sugere a presença de neuroinflamação, evidenciados pela microgliose e astrogliose reativas no estriado de animais neste modelo animal. Tendo em vista que este tratamento com LDX é um modelo válido de mania, poderíamos especular que exista uma relação entre a neuroinflamação e a fisiopatologia do TB. Entretanto, ressaltamos que o número limitado de animais que utilizamos nas análises relatadas neste trabalho nos impede de realizar afirmações consistentes acerca do tema abordado. Sendo assim, este estudo necessita ser continuado, para que possamos comprovar os dados obtidos até o momento. Para isso, temos como perspectivas futuras:

- 1) Aumentar o tamanho amostral do estudo para 5 animais por condição, a fim de finalizarmos este estudo-piloto com poder estatístico adequado. Em caso dos resultados comprovarem os resultados obtidos até o presente momento, realizaremos um trabalho mais abrangente no qual incluiremos análises complementares relativas a comportamento, marcadores inflamatórios, neurotróficos e parâmetros gliais.
- 2) Confirmar se o uso de LDX, usado para mimetizar um quadro de mania, é capaz de alterar os parâmetros gliais estudados neste trabalho. Se isto se confirmar, nossos dados contribuiriam de forma significativa para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TB, assim como abriria uma nova área de investigação para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.
- 3) Uma vez confirmadas as alterações gliais no modelo animal de mania acima descrito, pretendemos estudar neste modelo novos potenciais agentes terapêuticos para o tratamento do TB, como por exemplo, os hormônios esteróides. Isso porque tem sido observado na literatura que neuroesteróides, tais como a progesterona e seus metabólitos, são apontados como moléculas que apresentam potencial terapêutico em doenças neurais (conforme consta em artigo de revisão publicado recentemente por

nosso grupo - Bristot *et al.*, 2014) e seria relevante avaliar os efeitos destes compostos também em parâmetros gliais.

REFERÊNCIAS ADICIONAIS

Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C e Krieglstein J. S100B protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine- induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5- HT1A- receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 2000; 858: 121-28.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K e Walter P. The cytoskeleton. In: *Molecular biology of the Cell*, Garland Publishing, New York. 2002; 780-820.

Anderson CM e Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and functions physiological. *Glia.* 2000; 32: 1-14.

Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, Gonçalves CA, Kapczinski F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2007 Sep; 153: 27-32.

APA. Associação Psiquiátrica Americana. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-IV-TR. 4 ed. rev. e amp. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Araque A e Perea G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia.* 2004; 47: 241-8.

Aylward EH, Roberts-Twillie JV, Barta PE, Kumar AJ, Harris GJ, Geer M, et al. Basal ganglia volumes and white matter hyperintensities in patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 1994 May; 151: 687-93.

Barret KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Capítulo 12: Controle da postura e do movimento; AMGH Porto Alegre. 2014; 227-55.

Beanroch EE. Microglia. Multiple roles in surveillance, circuit shaping and response injury. *Neurology.* 2013; 81: 1079–88.

Beaulieu JM e Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*. 2011; 63: 182-217.

Bondan EF, Lallo MA, Dagli ML, Sanchez M, Graca DL [Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model]. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2003; 61: 642-49.

Bristot G, Ascoli B, Gubert C, et al. Progesterone and its metabolites as therapeutic targets in psychiatric disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 2014 Jun. 18: 679-90.

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*. 2008 Jan; 28: 264-78.

Colangelo AM, Alberghina L, Papa M - Astroglisis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters*. 2014; 565: 59–64.

Collingridge GL, Lester RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev*. 1989; 41: 143–210.

Dagdan E, Morris DW, Campbell M. Functional assessment of a promoter polymorphism in S100B, a putative risk variant for bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011; 13: 691–9.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 2001; 65: 1–105.

Davies C, Sanger DJ, Steinberg H, Tomkiewicz M, U'Prichard DC. Lithium and alpha-methyl-p-tyrosine prevent "manic" activity in rodents. *Psychopharmacologia*. 1974; 36: 263-74.

DelBello MP, Zimmerman ME, Mills NP, Getz GE, Strakowski SM. Magnetic resonance imaging analysis of amygdala and other subcortical brain regions in adolescents with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2004 Feb; 6:43-52.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 2003; 60: 540-51.

Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature.* 1996; 381: 71–75.

Einat H. Modelling facets of mania--new directions related to the notion of endophenotypes. *Journal of psychopharmacology.* 2006; 20: 714-22.

Eng, LF, Lee YL. Intermediate filaments in astrocytes. In: *Neuroglia*, Kettenmann, H. e Ransom, B.R., Oxford University Press, New York. 1995; 650-66.

Erecinska M e Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1990; 35: 245–96.

Fernandes BS, Gama CS, Ceresér KM et al. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorder: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res.* 2011; 45: 995-1004.

Feresten AH, Barakauskas V, Ypsilanti A, et al. Increased expression of glial fibrillary acidic protein in prefrontal cortex in psychotic illness. *Schizophr Res.* 2013 Oct; 150:252-7.

Fiorino DF, Phillips AG Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after D-amphetamine-induced behavioral sensitization. *J Neurosci.* 1999; 19: 456-63.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007; 47: 681-98.

Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*. 1984; 42: 1–11.

Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC et al. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. *Neurochemical research*. 2006a; 31: 699-703.

Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2006b. 31: 326-32

Frey BN, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disord* 2006c; 8: 275-80.

Fritz G e Heizmann CW. 3D structures of the calcium and zinc binding S100 proteins. In: *Handbook of Metalloproteins*. W. Bode, A. Messerschmidt, M. 2004; 1-12.

Fu R, Shen Q Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Mol Neurobiol*. 2014; 49:1422–34.

Gazalle FK, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, et al. Early diagnosis of bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr*. 2005 Mar; 27: 83-4

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010; 330: 841–45.

Giulian D, Haverkamp LJ, Yu JH, Karshin W, Tom D et al. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J Neurosci.* 1996; 16: 6021-37.

Glantz LA, Lewis DA. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2000 Jan; 57: 65-73.

Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1988; 12: 421-30.

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

Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neurosci.* 2007; 10: 1387-94.

Headley PM, Grillner S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci.* 1990; 11: 205-11.

Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2008; 28: 7231-43.

Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R. and Rauvala, H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by ampheterin and S100 proteins through receptor glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 40096-105.

Ito D, Imai Y, Ohsawa K, et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research.* 1998; 57: 1-9.

Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J. Neurosci.* 1998; 18: 1979– 85.

Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, Kauer-Sant'anna M, Grassi-Oliveira R, Post RM. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32: 675-92.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*, 4th edition, 1991. Chapter 43; 853-867.

Kaplan H, Sadock B. *Kaplan and Sadock's synopsis of psychiatry – behavioral sciences/clinical psychiatry*. 8th ed. Baltimore, MD; Williams & Wilkins; 1998.

Klanker M, Feenstra M, Denys D. Dopaminergic control of cognitive flexibility in humans and animals. *Frontiers in neuroscience.* 2013; 7: 201.

Kögel, D., Peters, M., König, H.G., Hashemi, S.M.A., Bui, N.T., Arolt, V., Rothermundt, M. and Prehn, J.H.M. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neurosc.* 2004; 127: 913-20.

Kolar D, Keller A, Golfinopoulos M, Cumyn L, Syer C et al. Treatment of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychiatric disease and treatment.* 2008; 4: 107-21.

Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 1993; 260: 95–7.

Kovacsics CE, Gottesman, II, Gould TD. Lithium's antisuicidal efficacy: elucidation of neurobiological targets using endophenotype strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009; 49:175-98.

Leme RJ, Chadi G. Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2001; 59: 483-92.

Lent, R. In. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

Leonard BE, Schwarz M, Myint AM. The metabolic syndrome in schizophrenia: is inflammation a contributing cause? *J Psychopharmacol*. 2012; 13: 33–41.

Lundy-Ekman L. Neurociência: fundamentos para reabilitação. 2ª Ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2004.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology&Biological Psychiatry* 2004; 28: 209–24.

Machado-Vieira, R.; Bressan, R.A.; Frey, B.; Soares, J.C. As bases neurobiológicas do transtorno bipolar. *Rev. Psiq. Clín*. 2005; 32: 28-33.

Marchand e Yurgelun-Tood - Striatal structure and function in mood disorders: a comprehensive review. 2010.

Marchand et al. Striatal and cortical midline activation and connectivity associated with suicidal ideation and depression in bipolar II disorder. *J Affect Disord*. 2011 Oct; 133: 638-45.

Marchand WR, Lee JN, Suchy Y, et al. Aberrant functional connectivity of cortico-basal ganglia circuits in major depression. *Neurosci Lett*. 2012 Apr; 514: 86-90.

Martin, J.H- Neuroanatomia texto e atlas 4ª Ed. 2013. Capítulo 14: 325 – 354.

Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*.1977; 195: 1356–58.

Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry* 2011 Mar; 68: 241-51.

Mink, J.W. Basal Ganglia. In: ZIGMOND, M.J. et al. *Fundamental neuroscience*. San Diego: Academic Press, 1999. p. 951 - 971.

Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med.* 2006; 829–34.

Pekny M, Levéen P, Pekna M, Eliasson C, Berthold CH, Westermark B, Betsholtz C. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J.* 1995 Apr; 14:1590-8.

Pekny M, Pekna. Review Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *MJ Pathol.* 2004 Nov; 204: 428-37.

Perry VH, Nicoll JAR and Holmes C. Microglia in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 2010; 6: 193–201.

Perea, G. et al. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. . *Trends in neurosci.* 2009; 32: 421-31.

Pinto SS, Gottfried C, Mendez A. Immunocytotoxicity and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters.* 2000; 486: 203–7.

Pfaffenseller B, Gama CS, Kapczinski F, Duarte JA, Kunz M. Anatomical faces of neuroprogression in bipolar disorder. *Neuropsychiatry* 2012; 2: 1-2.

Post RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res.* 2007 Dec; 41: 979-90.

Ransohoff RM, Cadorna AE. The myeloid cells of the central nervous parenchyma. *Nature.* 2010; 468: 253–62.

Rodnight R, Gonçalves CA, Wofchuk ST e Leal R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Mar; 30: 325-38.

Rosa AR, Singh N, Whitaker E, et al. Altered plasma glutathione levels in bipolar disorder indicates higher oxidative stress; a possible risk factor for illness onset despite normal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Psychol Med.* 2014 Jan; 27: 1-10.

Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H.M. and Arolt, V. S100B in brain Damage and Neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 2003; 60: 614-32.

Rothermundt M, Ohrmann P, Abel S. Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased S100B serum concentrations and elevated myo-inositol. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 13: 361–4.

Rothermundt M, Ahn JN, Jörgens S. S100B in schizophrenia: an update. *Gen Physiol Biophys.* 2009; 13: F76–81.

Rowley HL, Kulkarni R, Gosden J, Brammer R, Hackett D et al. Lisdexamfetamine and immediate release d-amphetamine - differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in

freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activity. *Neuropharmacology*. 2012; 63: 1064-74.

Ryoun Kim H, Kyung Lee M, Park DB. Increased serum S100B protein in chronic schizophrenic patients in Korea. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 13:1561–3.

Schafer DP et al. The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*. 2013; 61: 24-36.

Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* 1995 Oct; 52: 805-18; discussion 19-20.

Shahana N, DelBello M, Chu WJ , Jarvis K , Fleck D, Welge J, Strakowski S, Adler C. Neurochemical alteration in the caudate: Implications for the pathophysiology of bipolar disorder - *Psychiatry research*. 2011 Aug; 193: 107-12.

Shim IH, Woo YS, Jun TY, Bahk WM. Mixed-state bipolar I and II depression: time to remission and clinical characteristics. *J Affect Disord*. 2014 Jan; 152-54: 340-6.

Soulas C, Donahue RE, Dunbar CE, et al. Genetically modified CD34+ hematopoietic stem cells contribute to turnover of brain perivascular macrophages in long-term repopulated primates. *Am J Pathol*. 2009; 174: 1808–17.

Souza, FGM. Tratamento do transtorno bipolar: Eutimia. *Rev Psiq Clín*. 2005; 32: 63-70.

Sofroniew MV – Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation, *Trends Neurosci*. 2009; 32: 638-47.

Steiner J, Bernstein HG, Bielau H. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci*. 2007; 8:2.

Steiner J, Myint AM, Schiltz K. S100B Serum levels in schizophrenia are presumably related to visceral obesity and insulin resistance. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010; 2010: 480707.

Stertz L, Magalhaes PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Current opinion in psychiatry.* 2013; 26: 19-26.

Stipursky J et al. Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. In: ULRICH, A.H. (Org.). *Stem Cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy.* 2010; 1: 145-64.

Stipursky J et al. Neuron glia signaling: implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sci.* 2011; 89: 524-31.

Stipursky, J. et al. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. *Neurochem Res.* 2012; 37: 2402-18.

Strakowski SM, DelBello MP, Sax KW, Zimmerman ME, Shear PK, Hawkins JM, et al. Brain magnetic resonance imaging of structural abnormalities in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1999 Mar; 56: 254-60.

Strakowski SM, Adler SM, DelBello MP. Volumetric MRI studies of mood disorders: do they distinguish unipolar and bipolar disorder? *Bipolar Disord.* 2002 Apr; 4: 80-8.

Strakowski SM, DelBello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Molecular Psychiatry.* 2005; 10: 105-116.

Stromberg I, Bjorklund H, Dahl D, Jonsson G, Sundstrom E et al. Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. *Brain research bulletin.* 1986; 17: 225-36.

Suppes T e Dennehy EB. Transtorno Bipolar. Tradução Marina Fodra. Porto Alegre: Artmed, 2009.

Swann AC. Mechanisms of impulsivity in bipolar disorder and related illness. *Epidemiol. Psichiatr. Soc.* 2010; 19:120–30.

Van Eldik LJ e Wainwright MS. The janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2003; 21: 97-108.

Verkhatsky A, Rodríguez JJ, Parpura V. Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol.* 2013 March; 8: 149158.

Walton HS, Dodd PR. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2007; 50: 1052–66.

Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci.* 1995; 17: 203–11.

Wofchuk ST and Rodnight R. Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Develop Brain Res.* 1995; 85: 181-86.

Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar Disord* 2013 Feb; 15: 1-44.

Zhang XY, Xiu MH, da Chen C. Increased S100B serum levels in schizophrenic patients with tardive dyskinesia: association with dyskinesic movements. *J Psychiatr Res.* 2010; 13: 429–33.

