

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospeção



Dissertação

**EFEITO DO EXTRATO DE MIRTILO EM PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE MANIA INDUZIDO POR CETAMINA**

Gabriela Nogueira Debom

Pelotas, 2016

Gabriela Nogueira Debom

**EFEITO DO EXTRATO DE MIRTILO EM PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE MANIA INDUZIDO POR CETAMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Roselia Maria Spanevello

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Marta Gazal

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D287e Debom, Gabriela Nogueira

Efeito do extrato de mirtilo em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos submetidos a um modelo experimental de mania induzido por cetamina / Gabriela Nogueira Debom ; Roselia Maria Spanevello, orientadora. — Pelotas, 2016.

76 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Transtorno bipolar. 2. Estresse oxidativo. 3. Mirtilo. 4. Citocinas. 5. Sistema nervoso central. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Gabriela Nogueira Debom

Efeito do Extrato de Mirtilo em Parâmetros Inflamatórios e de Estresse
Oxidativo em Ratos Submetidos a um Modelo Experimental de Mania Induzido
por Cetamina

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 01 de março de 2016

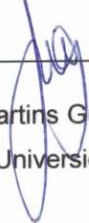
Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello (Orientadora) Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof^a. Dr^a. Gabriele Cordenonzi Ghisleni. Doutora em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.



Prof. Dr. Jessié Martins Gutierrez. Doutor em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus. Somente Ele é o responsável por permitir que todas estas pessoas abaixo citadas estivessem presentes ao meu lado durante toda a minha formação.

Agradeço principalmente ao meu noivo, que me apoia incondicionalmente em qualquer decisão tomada por mim, mesmo que isto signifique ouvir incansavelmente sobre a catalase e sobre a louça do laboratório, durante dois anos, e sorrir diante de variadas, porém constantes, reclamações. Matheus, como tu gostas de dizer, te tornas também um mestre em bioquímica. Eu te amo por tudo isso e por mais um milhão de outras coisas.

Agradeço imensamente aos meus pais, cada um a sua maneira, que me educaram e fomentaram em mim a vontade de não apenas completar a graduação, mas seguiram me apoiando para a continuação de meus estudos em uma pós-graduação. Sou muito grata aos ensinamentos que eles me deram e à confiança que me dão até hoje, sem cobranças sobre tempo e responsabilidades. Amo vocês.

Agradeço também a todo o restante da minha família, por me apoiarem em tempos difíceis, de incertezas e lapsos de vontade e garra. Muito obrigada por sempre acreditarem no meu potencial, e sempre me fazerem enxergar que eu tenho uma posição privilegiada com vocês ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos, os de fé e os de sempre, por tantos compromissos adiados, sempre com as mesmas desculpas de muito trabalho e muito estudo, e principalmente falta de tempo. E aos amigos mais próximos, que dividiam momentos de desabafo, de dúvida na profissão, meu muito obrigado de coração, pois estes lamentos compartilhados sempre me deram força pra continuar tentando melhorar a cada dia. Vocês todos são muito especiais pra mim, e cada um da sua forma e carisma, me ensinam o quanto eu preciso relaxar e aproveitar os minutos de paz e amizade.

Agradeço aos meus colegas do laboratório NEUROCAN e do laboratório de Biomarcadores, que me ajudaram nas técnicas de laboratório, e me auxiliaram em partes do trabalho que seriam impossíveis de realizar sozinha. Agradeço principalmente meus colegas Mayara e Carlus, por não só fazer isso, mas também compartilhar finais de semana de trabalhos e incansáveis discussões sobre nossos resultados e planos futuros para a pesquisa e o laboratório.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Roselia Spanevello, pela confiança em meu trabalho e meu potencial, além da amizade e do companheirismo. Agradeço por fazer parte da minha formação pessoal e profissional, e por sempre me tranquilizar nos momentos complicados. Também devo agradecer aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela parceria e também pelos ensinamentos, não só relacionados ao presente trabalho, mas acerca de vários aspectos da profissão.

Agradeço à Universidade Federal de Pelotas, e em especial ao Biotério Central pela ótima estrutura e qualidade. Agradeço também a sua grande equipe, pela disponibilidade sempre que solicitada e paciência em ensinar, e pelo carinho em lidar com uma parte tão importante da nossa pesquisa.

Agradeço à minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Marta Gazal, pela disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento das técnicas utilizadas, e à equipe do laboratório de Neurociências Clínicas da Universidade Católica de Pelotas, onde desenvolvi grande parte do trabalho.

Agradeço finalmente às agências de fomento por permitirem a realização deste trabalho.

Sometimes scientific progress is not based on a discovery or the generation of new data but on a change of viewpoint that allows one to see a set of already existing data in a new light.

Michael Reth

Resumo

DEBOM, Gabriela Nogueira. **Efeito do extrato de mirtilo em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos submetidos a um modelo experimental de mania induzido por cetamina**. 2016. 76f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é uma desordem psiquiátrica caracterizada por estados alternados de depressão e mania ou hipomania. Estudos demonstram que o estresse oxidativo e a inflamação estão relacionados a complicações associadas com o THB. O mirtilo (*Vaccinium* sp.) é uma fruta que possui ação antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de mirtilo em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos submetidos a um modelo experimental de mania induzido por cetamina. Sessenta ratos machos foram divididos em seis grupos: I (controle), II (lítio), III (extrato de mirtilo), IV (cetamina), V (cetamina + lítio) e VI (cetamina + extrato de mirtilo). Os animais dos grupos III e VI receberam extrato de mirtilo por via oral na dose de 200 mg/kg e os animais dos grupos II e V receberam lítio (45 mg/kg via oral) do 1º ao 14º dia. A partir do 8º dia os animais dos grupos IV, V e VI receberam também uma dose de cetamina (25 mg/kg) via intraperitoneal uma vez ao dia. Ao final do tratamento, no 15º dia, os animais receberam uma única dose de cetamina ou salina e após 30 minutos a atividade locomotora foi avaliada utilizando teste de campo aberto. Após este teste, os animais foram submetidos à eutanásia e o córtex cerebral, hipocampo e estriado foram dissecados para avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo tiólico total; atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). O soro foi usado para a determinação das citocinas IL-6 e IL-10. O tratamento com o extrato de mirtilo e com lítio foi capaz de prevenir a hiperlocomoção dos animais induzida por cetamina ($P < 0.05$). Níveis aumentados de TBARS foram observados em todas as estruturas cerebrais dos animais do grupo IV ($P < 0.05$) e o tratamento com mirtilo e lítio foram capazes de prevenir este efeito. O tratamento com extrato de mirtilo ou lítio preveniu a diminuição nas atividades das enzimas CAT e SOD e no conteúdo tiólico total induzida pela cetamina em córtex cerebral e hipocampo ($P < 0.05$). No estriado de animais tratados com cetamina foi observada uma diminuição na atividade da GPx ($P < 0.05$) sendo que o tratamento com o extrato de mirtilo foi capaz de prevenir este efeito. Em animais do grupo IV foi observado um aumento significativo nos níveis de IL-6, os quais foram prevenidos pelo tratamento com lítio. Nenhuma alteração foi encontrada nos níveis de IL-10. Pode-se concluir através de nossos achados que a administração do extrato de mirtilo preveniu a hiperlocomoção e o estresse oxidativo induzido por cetamina em ratos. Estes resultados foram

semelhantes aos obtidos com o tratamento com lítio, sugerindo assim um potencial terapêutico do extrato de mirtilo na prevenção da recorrência de novos episódios maníacos.

Palavras-chave: transtorno bipolar; mirtilo; estresse oxidativo, citocinas, sistema nervoso central.

Abstract

DEBOM, Gabriela Nogueira. **Efeito do extrato de mirtilo em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos submetidos a um modelo experimental de mania induzido por cetamina.** 2016. 76f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016

Bipolar disorder (BD) is a chronic and severe psychiatric disorder that is associated with alternating states of depression and mania or hipomania. Many studies have suggested that oxidative stress and inflammation are associated with complications in BD. Blueberry (*Vaccinium* sp.) is a fruit with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties. The aim of the present study was to evaluate the effect of blueberry extract on inflammatory and oxidative stress parameters in rats submitted to an animal model of ketamine-induced mania. Sixty male adult rats were divided into six groups: I (control); II (lithium carbonate); III (blueberry extract); IV (ketamine); V (ketamine + lithium carbonate); VI (ketamine + blueberry extract). Animals of groups III and IV received blueberry extract 200 mg/kg once a day and groups II and V received lithium carbonate 45 mg/kg twice a day for 14 days by oral administration. From the 8th to the 14th day animals in groups IV, V and VI also received ketamine (25 mg/kg) once a day by intraperitoneal route. On the 15th day animals received a single injection of ketamine or saline and the locomotor activity was evaluated in an open-field apparatus after 30 min, and the cerebral structures such as cortex, hippocampus and striatum were collected to evaluate oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total thiol content, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The serum was collected to evaluate IL-6 and IL-10. Both treatment with blueberry extract and lithium were able to prevent hyperlocomotion induced by ketamine in the animals tested ($P<0.05$). Elevated levels of TBARS were observed in all cerebral structures of animals in group IV ($P<0.05$) and the treatment with blueberry and lithium was able to prevent this effect. Treatment with blueberry extract and lithium also prevented a decrease in CAT and SOD activities in cerebral cortex and hippocampus ($P<0.05$). A decrease in GPx activity ($P<0.05$) was observed in the striatum but treatment with blueberry extract was able to prevent this effect. An increase in IL-6 levels was observed in the animals of group IV, and the treatment with lithium was able to prevent this effect. No changes were found in IL-10 levels. According to our results, we were able to conclude that treatment with blueberry extract prevented hyperlocomotion and oxidative stress induced by ketamine in rats. These findings were similar to treatment with lithium carbonate, suggesting a therapeutic potential of blueberry extract in the prevention of the recurrence of mania episodes.

Keywords: bipolar disorder, blueberry, oxidative stress, cytokines, brain

Lista de Figuras

Figura 1 Sistemas de defesa antioxidante enzimática para neutralização de radicais livres derivados de oxigênio. 24

Lista de Tabelas

Tabela 1	Exemplos de espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio.....	23
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

CAT	Catalase
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduced
GSSG	Glutathione oxidized
IFN- γ	Interferon- γ
IL-10	Interleukin 10
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
NMDA	N-methyl D-aspartate
PCR	Protein C-reactive
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Fator de transformação e crescimento- β
THB	Transtorno de humor bipolar
TNF α	Fator de necrose tumoral α

Sumário

1.	Introdução	14
2.	Objetivos	17
	Objetivo geral	17
	2.2. Objetivos Específicos	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA	18
	Transtorno de Humor Bipolar (THB)	18
	Estresse Oxidativo	21
	Inflamação	26
	Mirtilo e suas propriedades terapêuticas	28
4.	Manuscrito.....	32
5.	Conclusões	65
6.	Referências Bibliográfica	67
	ANEXO.....	74

1. Introdução

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é um transtorno caracterizado pela recorrência de episódios depressivos e maníaco ou hipomaníacos. É um distúrbio debilitante e severo, e ainda que amplamente estudado, sua fisiopatologia ainda não está totalmente elucidada (BUDNI et al., 2013). O THB se apresenta em uma porcentagem grande na população mundial, além de estar associado a uma ampla quantidade de comorbidades, dessa forma tornando-o um subestimado problema de saúde pública (DELL'AGLIO et al., 2013).

A existência de comorbidades sistêmicas reforça a hipótese de as doenças psiquiátricas apresentarem fisiopatologia não só relacionadas a alterações de neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC), mas em distúrbios no organismo como um todo (MAGALHÃES et al., 2012). No caso do THB, além de envolver os sistemas de neurotransmissão dopaminérgico, glutamatérgico, gabaérgico, entre outros (MACHADO-VIEIRA et al., 2005), o estresse oxidativo pode estar relacionado à progressão da doença, com a piora do quadro clínico do paciente.

O estresse oxidativo é representado pelo desequilíbrio persistente entre processos pró-oxidantes e o potencial antioxidante do organismo (SIWEK, 2013). O resultado deste desequilíbrio pode gerar danos a biomoléculas, como as membranas celulares, proteínas e o DNA (CZERSKA et al., 2015). O cérebro é extremamente propício a estes danos, uma vez que possui intenso metabolismo utilizando o oxigênio, e desta maneira gera uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS). Além disso, sua capacidade antioxidante é limitada em relação a esta alta produção de radicais livres (SIWEK, 2013). Neste sentido, diversos estudos têm associado o estresse oxidativo com a neuroprogressão do THB (GHANIZADEH e BERK, 2013; SOUSA et al., 2014).

Além do estresse oxidativo, alguns autores também tem descrito o processo inflamatório como um mecanismo chave para a neuroprogressão do THB (KAPCZINSKI et al., 2011; RODA et al., 2015; MUNEEER, 2016). Um aumento nos níveis de mediadores inflamatórios pode ser observado tanto no SNC como em tecidos periféricos (BARBOSA et al., 2014; NASSAR e AZAB, 2014), e elevadas taxas de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina 6 (IL-6), estão associadas a episódios maníacos e depressivos, em relação às observadas em pacientes eutímicos (BERK et al., 2011; RODA et al., 2015). Desta maneira, o ambiente pró-inflamatório, associado ao caráter pró-oxidante, poderia estar envolvido com a fisiopatologia de THB, ou a piora do quadro clínico do paciente, através do aumento da recorrência dos episódios agudos.

A fim de auxiliar na pesquisa de novas hipóteses para a fisiopatologia, diagnóstico e tratamento do THB, a presença de modelos animais é de importante valia. Os modelos animais utilizados para o THB geralmente baseiam-se na presença de sintomas de episódios agudos, ou maníacos ou depressivos. Uma vez que a mania é o episódio definidor para o diagnóstico do THB, são destacados os modelos que mimetizem a indução de sintomas maníacos, através da indução da hiperlocomoção nos animais (YOUNG e DULCIS, 2015). Entre eles, o tratamento com cetamina é utilizado para a indução do estado tipo-maníaco, agindo nos receptores n-metil d-aspartato (NMDA), alterando o perfil de neurotransmissão do glutamato no SNC (GHEDIM et al., 2012; GAZAL et al., 2014; SILVA et al., 2010).

O tratamento do THB é geralmente feito através do lítio, medicamento de primeira escolha, porém este fármaco apresenta severos efeitos adversos. Em conjunto com a grande diferenciação da sintomática de acordo com cada paciente, e da dificuldade em se estabelecer uma dosagem específica sem efeitos indesejáveis, a pesquisa por tratamentos alternativos torna-se necessária (LAFER e NERY, 2011). Neste contexto, diversos compostos derivados de plantas têm sido estudados, por apresentarem compostos com potentes atividades antioxidantes (SUBASH et al., 2014). O mirtilo (*Vaccinium* sp.), também conhecido como blueberry, é uma pequena fruta originária da

América do Norte que quando madura adquire coloração azul arroxeada e sabor doce-ácido (JESUS, 2013).

O mirtilo possui várias propriedades terapêuticas importantes como ação antioxidante (DIACONEASA et al., 2015); neuroprotetora (WANG, 2013), antiinflamatória (SHUKITT-HALE et al., 2005) e antinociceptiva (RAMIREZ et al., 2010) também podendo atuar nos mecanismos de melhora da memória (JOSEPH et al., 2009). Esses benefícios do mirtilo têm sido associados aos compostos naturais encontrados na fruta, principalmente as antocianinas. As antocianinas são flavonoides responsáveis pela grande variedade de cores de frutas e flores, que vão do vermelho ao azul (JESUS, 2013) apresentando em sua estrutura química grupamentos fenólicos que são potentes agentes antioxidantes (SKROVANKOVA et al., 2015).

Neste contexto, considerando que o THB apresenta um forte impacto na qualidade de vida dos pacientes, o desenvolvimento de novas terapias com eficácia de tratamento e redução de efeitos colaterais à medicação mostra-se uma iniciativa necessária e imediata. Sendo assim, o presente trabalho avaliou o efeito preventivo do tratamento com extrato de mirtilo na hiperlocomoção e parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em um modelo experimental de mania induzida por cetamina em ratos.

2. Objetivos

Objetivo geral

Investigar os efeitos do tratamento de extrato de mirtilo na hiperlocomção e parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em animais submetidos a um modelo de mania induzido por cetamina.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a ação preventiva do extrato de mirtilo e do carbonato de lítio na resposta comportamental do teste do campo aberto em animais submetidos a um modelo experimental de mania induzida por cetamina.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e conteúdo tiólico total em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo experimental de mania e/ou tratados com extrato de mirtilo ou carbonato de lítio.
- Analisar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo experimental de mania e/ou tratados com extrato de mirtilo ou carbonato de lítio.
- Mensurar os níveis das interleucinas 6 (IL-6) e 10 (IL-10) em soro de ratos submetidos ao modelo experimental de mania e/ou tratados com extrato de mirtilo ou carbonato de lítio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Transtorno de Humor Bipolar (THB)

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é um distúrbio crônico caracterizado pela alternância de episódios depressivos e maníacos ou hipomaníacos. A mudança cíclica entre estes polos opostos de humor distinguem este distúrbio das demais desordens psiquiátricas de humor, como a depressão maior (ENKHUIZEN et al., 2015). Deste modo, o THB também é reconhecido como uma complexa e debilitante condição neuropsiquiátrica, apresentando fisiopatologia e sintomas diferenciados (SZMULEWICZ, 2015).

O diagnóstico do THB é bastante dificultado, portanto existe uma grande variância entre os dados encontrados na literatura para a prevalência do transtorno. Segundo o DSM-V, o distúrbio afeta cerca de 1 a 5% da população mundial. Além disso, o THB é a 6ª principal causa de incapacidade física e psicológica em pacientes entre 15 e 44 anos (YOUNG e DULCIS, 2015; CASTRO-COSTA e SILVA, 2011). A perda de produtividade destes indivíduos nesta faixa etária em particular, combinada ao custo do tratamento ao longo da vida, gera um impacto muito grande na economia, demonstrando assim ser um problema não só de ordem psicológica, mas também de importância social.

Os episódios maníacos são definidos pela presença de sintomas eufóricos, como autoestima exagerada ou sensação de grandiosidade e poder, diminuição da necessidade de sono, loquacidade aumentada, pensamentos exagerados e aumento da distração. Além disso, podem-se observar comportamentos compulsivos, oriundos de julgamento inadequado, como a realização de compras exageradas, comportamento desinibido ou ofensivo, assim como promiscuidade sexual (YOUNG e DULCIS, 2015; DSM-V, 2013). Episódios hipomaníacos são aqueles onde o paciente apresenta estes sintomas maníacos de maneira não tão acentuada, sem causar maior prejuízo no funcionamento social ou profissional, porém associados a uma mudança clara no funcionamento que não é característica do indivíduo quando assintomático. A presença de psicose no

quadro clínico do paciente é característica do episódio maníaco (ENKHUIZEN et al., 2015; DSM-V, 2013).

Já o outro polo do distúrbio, a depressão, é caracterizado por sintomas como recorrência de pensamentos negativos, fadiga, sentimento de inutilidade e culpa, anedonia, além de distúrbios de apetite e sono. O episódio depressivo causa sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social, profissional e em outras áreas da vida do indivíduo (ENKHUIZEN et al., 2015; DSM-V, 2013). O período entre os estados extremos é denominado estado eutímico, e o paciente apresenta comportamento relativamente normal (YOUNG e DULCIS, 2015).

O diagnóstico do THB é realizado essencialmente através de exame clínico, baseado na presença ou ausência da sintomatologia que está descrita no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-V). Existem três tipos de THB: Transtorno de Humor Bipolar do Tipo I, sendo caracterizado pela presença de pelo menos um episódio maníaco ao longo da vida – sendo assim o tipo caracterizado como transtorno maníaco-depressivo clássico; o Transtorno de Humor Bipolar do Tipo II, definido pela alternância entre episódios de depressão e hipomania; e o Transtorno Ciclotímico, ou Ciclotimia, onde o paciente apresenta sintomas depressivos e maníacos ou hipomaníacos sem que os critérios sejam satisfeitos para serem considerados episódios (DSM-V, 2013). Embora o estado depressivo seja a condição sintomática mais frequente na vida do paciente portador de THB, e por isso seja responsável por grande parte da incapacitação gerada pelo transtorno, a condição definidora para o diagnóstico do THB é a ocorrência de pelo menos um episódio maníaco ou hipomaníaco (GOODWIN e JAMISON, 2007)

Apesar de ser um transtorno amplamente estudado e com grande quantidade de dados existentes na literatura, a fisiopatologia do THB ainda não é totalmente compreendida. Já está bem estabelecida a relação entre a presença de alguns genes de vulnerabilidade, e que há necessidade de interação destes genes com o ambiente (HAYDEN e NURNBERGER JR, 2006; BARNETT e SMOLLER, 2009). Estudos com gêmeos idênticos afirmam haver uma concordância de 61 a 75%, e o risco em parentes de primeiro grau situa-se em 1,5 a 15,5% (MICHELON e VALLADA, 2004). Deste modo, a existência de parentes diagnosticados como

bipolares é utilizada como informação relevante para o diagnóstico do paciente (DSM-V, 2013).

Além desta herdabilidade comprovada, existem já descritas diversas alterações bioquímicas e moleculares em sistemas de neurotransmissão. A neuroquímica no THB é muito complexa, apresentando alterações na regulação dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e colinérgico, além dos sistemas gabaérgico e glutamatérgico (MACHADO-VIEIRA et al., 2005). Levando em consideração que o THB é um distúrbio multifatorial, é importante ressaltar que existem diversas hipóteses que tentam explicar o surgimento da doença, porém ainda não há uma correlação entre estes diversos sistemas de neurotransmissão alterados e a própria etiologia. Ou seja, ainda não está bem descrito como se dá a interação metabólica entre estes sistemas e de que forma isto está influenciando no quadro clínico do paciente. Em adição a isto, diferentes estágios do THB estão associados a diferentes alterações em mecanismos biológicos, como modificações presentes em estágios precoces ou avançados da doença, ou até presentes em episódios maníacos ou em episódios depressivos, o que dificulta ainda mais o completo entendimento do transtorno (BUDNI et al., 2013; ENKHUIZEN et al., 2015).

Neste sentido, torna-se importante o desenvolvimento de estudos em modelos animais que tentem mimetizar as condições do THB. A validação de um modelo animal está baseada em três importantes características: mimetizar os sintomas da doença, reproduzir aspectos da sua fisiopatologia, e quando administrados agentes terapêuticos usualmente utilizados no tratamento, estes devem reverter os sintomas induzidos no animal (GHEDIM et al., 2012; VALVASSORI et al., 2013; SLATERRY e CRYAN, 2014). Vários modelos já foram testados para o THB, baseados na indução de sintomas de episódios maníacos, visualizados nos animais através da hiperlocomoção (YOUNG et al., 2011). Entre eles, o tratamento farmacológico com anfetamina (FREY et al., 2006; MORETTI et al., 2011) e também com ouabaína (BRÜNING et al., 2012; TONIN et al., 2014).

Atualmente a utilização de cetamina como um modelo de hiperlocomoção vem sendo estudada (GHEDIM et al., 2012; GAZAL et al., 2014). O modelo baseia-se na indução de alterações no comportamento e em parâmetros bioquímicos, uma vez que a cetamina liga-se não competitivamente ao receptor NMDA no SNC, inibindo a ação do seu neurotransmissor, o glutamato, em seu receptor. Existe

também ação da cetamina na captação da dopamina, que também é inibida, aumentando a atividade dopaminérgica. Estas alterações nos níveis de neurotransmissão são semelhantes aos encontrados no estado de mania dos pacientes com THB, o que possibilita ao tratamento com cetamina ser passível de funcionar como um modelo animal de mania (SILVA et al., 2010).

O tratamento usual para o THB é realizado através de fármacos estabilizadores de humor, sendo o carbonato de lítio o medicamento utilizado como primeira linha (NOLEN, 2015; ORUCH et al., 2014). O carbonato de lítio apresenta efeitos tanto em episódios maníacos quanto em episódios depressivos, além de atuar na prevenção da recorrência de novos episódios agudos (DINIZ et al., 2013). Apesar destes efeitos benéficos, diversos efeitos adversos são associados ao uso do carbonato de lítio, principalmente voltados a problemas de intoxicação (SHINE et al., 2015). Deste modo, o paciente necessita de monitoração constante dos níveis do fármaco no sangue, o que também dificulta a adesão ao tratamento (CASTRO-COSTA e SILVA, 2011; MAY et al., 2015).

Diversos estudos tem sugerido que o THB é um distúrbio neuroprogressivo, ou seja, apresente um curso progressivo de dano e disfunção, e consequentemente um aumento dos sintomas e piora do quadro clínico do paciente. Esta afirmação pode ser justificada pela observação de uma progressiva redução dos períodos eutímicos no paciente de acordo com o avanço da doença. Além disso, a maior quantidade de episódios maníacos ou depressivos está relacionada com redução da resposta apropriada ao tratamento – farmacológico e psicológico – e o aumento de comorbidades associadas (BERK et al., 2011; BUDNI et al., 2013). Neste sentido, o avanço da doença poderia levar a um agravamento na sua fisiopatologia, envolvendo novos sistemas do organismo, e desta maneira favorecendo a vulnerabilidade a novos episódios, ocorrendo cada vez mais frequentemente, e reduzindo o potencial de resposta frente ao tratamento.

Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio persistente entre processos pró-oxidantes e o potencial antioxidante do organismo, resultado de uma expressão exacerbada de espécies reativas, acompanhada ou não da

redução destes mecanismos de defesa antioxidante (SIWEK et al., 2013). O aumento da geração de espécies reativas pode levar a sérios danos na estrutura das células, como nas membranas celulares, proteínas e DNA, e em consequência causar alterações nas suas funções (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; CZERSKA et al., 2015).

Os processos oxidativos ocorrem no organismo na maioria das vezes de forma benéfica, auxiliando em funções fisiológicas normais. Espécies pró-oxidantes podem proteger células contra infecções combatendo possíveis patógenos, ou até regular a concentração de cálcio intracelular envolvido em processos de fosforilação de proteínas (SALIM, 2014). Estas espécies pró-oxidantes podem ser substâncias derivadas de oxigênio, e deste modo são denominadas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs, ou no inglês *ROS*). O termo *ROS* compreende tanto os radicais livres – substâncias com elétrons desemparelhados e por isso capazes de receber elétrons – quanto derivados não-radicaís (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; CZERSKA et al., 2015), como demonstrado na Tabela 1.

Nome completo	Fórmula	Estrutura
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	Não-radical
Radical Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Radical
Radical Hidroxil	$OH^{\cdot}$	Radical

Tabela 1: Exemplos de espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio.

As reações redox são base de diversas vias de regulação celular, e normalmente há um equilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes presentes no organismo (MAGALHÃES et al., 2012). Substâncias antioxidantes são aquelas que impedem, previnem ou removem o dano oxidativo de moléculas alvo. Defesas antioxidantes enzimáticas são agentes

que removem cataliticamente as ROS, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), que remove o $O_2^{\cdot -}$, convertendo-o a H_2O_2 , e a enzima catalase (CAT), responsável pela dismutação do H_2O_2 para geração de O_2 . As atividades destas duas enzimas em conjunto são responsáveis por neutralizar a ação nociva dos radicais de oxigênio, formando ao final da cascata uma molécula de menor capacidade reativa e consequentemente que irá representar menor dano ao organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; LUSHCHAK, 2014).

Além da SOD e da CAT, existem diversas outras enzimas com significativa capacidade antioxidante. Entre elas, as reações realizadas pelas enzimas glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GR) são importantes por também ajudar na neutralização de radicais de oxigênio (LUSHCHAK, 2014). A GPx realiza a remoção do H_2O_2 (e alguns outros peróxidos) através da oxidação da glutathione reduzida (GSH), uma molécula contendo grupo tiol. A reação leva à formação de glutathione na forma oxidada (GSSG), que pode ser novamente reduzida a GSH pela enzima glutathione redutase (GR) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MUNEEB, 2016). Todas estas cascatas enzimáticas estão representadas na Figura 1.

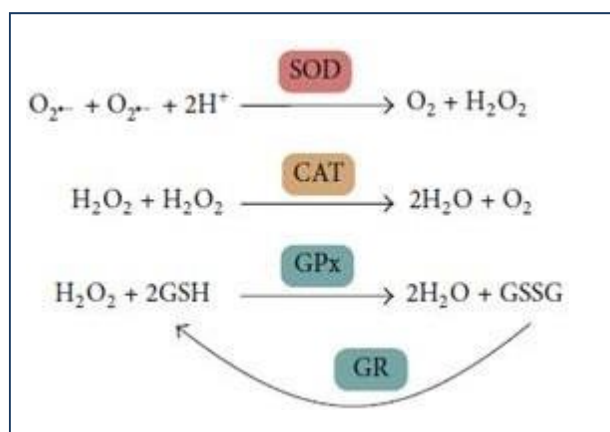


Figura 1: Sistemas de defesa antioxidante enzimática para neutralização de radicais livres derivados de oxigênio. Adaptado de PENG et al., 2014.

Estudos sugerem que o estresse oxidativo pode estar relacionado com caráter neuroprogressivo de diversas doenças que atingem o SNC, como

câncer, doenças neurodegenerativas, e atualmente com os transtornos psiquiátricos, incluindo o THB (GHANIZADEH e BERK, 2013; SOUSA et al., 2014). O cérebro é particularmente vulnerável as ROS, devido principalmente a sua alta utilização de oxigênio para o metabolismo de suas células, além de apresentar alto conteúdo lipídico e íons que podem reagir em ligações redox e uma taxa mais baixa de enzimas com potencial antioxidante (SIWEK et al., 2013). Neste contexto, o estresse oxidativo poderia funcionar como um estressor fisiológico capaz de funcionar como um “*trigger*”, ou um gatilho, para o desenvolvimento e/ou progressão de diversas doenças (SALIM, 2014). Logo, alterações que estejam relacionadas tanto ao aumento de geração de ROS, como a diminuição destas poucas defesas já existentes, podem explicar a fisiopatologia ou o surgimento de novos episódios maníacos ou depressivos no THB.

De acordo com a literatura, existe relação entre o THB e disfunção nas mitocôndrias, organelas responsáveis pela grande parte dos processos oxidativos e fonte da geração de ROS. Esta disfunção é evidenciada pela presença de comorbidades envolvendo doenças mitocondriais, a ocorrência de pacientes com polimorfismos específicos ou mutações em seu DNA mitocondrial, e também acerca do efeito que o carbonato de lítio apresenta em relação ao metabolismo mitocondrial, aumentando a atividade de complexos da cadeia transportadora de elétrons no SNC (SIWEK et al., 2013; BERK et al., 2011).

Como já mencionado anteriormente, o aumento dos parâmetros oxidativos pode estar relacionado a danos gerados em estruturas celulares diversas. Neste sentido, diversos estudos já descrevem o aumento da peroxidação lipídica, associada ao aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo inclusive o marcador sistêmico mais consistente entre todos os dados na literatura encontrados em pacientes e modelos animais do THB. Os lipídeos são os maiores componentes das membranas de neurônios e da bainha de mielina, logo o dano diretamente ligado a eles pode representar um comprometimento muito expressivo ao funcionamento do SNC (KAPCZINSKI et al., 2011; JOSHI e PRATICÒ, 2014).

Alterações na atividade de enzimas antioxidantes também já foram descritas em relação ao THB, porém alguns dados encontrados ainda são controversos. Alguns estudos observaram a diminuição das enzimas SOD, CAT e nos níveis de glutatona relacionados à pacientes portadores de THB comparados a indivíduos controle, principalmente quando estes se encontravam em algum episódio agudo da doença (maníaco ou depressivo) (AYDEMIR et al., 2014; GHANIZADEH e BERK, 2013) . Logo, sugere-se que além do estresse oxidativo estar relacionado com a neuroprogressão do THB, ele seria condicionalmente associado aos períodos agudos.

Embora alguns marcadores de estresse oxidativo já tenham sido relacionados a diferentes fases do THB em contraste a pacientes eutímicos, não se pode afirmar que essa relação seja verdadeira. Ainda que contraditório, vários estudos observaram a ativação das defesas antioxidantes, representadas pelo aumento da atividade das enzimas SOD, GPx e GR, tanto em modelos animais quanto em pacientes portadores de THB (SALIM, 2014). Estes resultados contraditórios são explicados pelos autores como a presença de um mecanismo compensatório ao estado pró-oxidativo existente no organismo (MAGALHÃES et al., 2012). Em adição a isto, o tratamento com fármacos estabilizadores de humor foi capaz de normalizar este aumento de atividade, principalmente relacionado à enzima SOD (SIWEK et al., 2013).

Devido ao surgimento nos últimos anos de vários trabalhos abordando a relação do estresse oxidativo com THB, este tema tem adquirido relevância clínica, sendo que estudos têm levantado a hipótese de que ele seria parte importante da fisiopatologia e neuroprogressão do distúrbio. Deste modo, torna-se necessário o estudo de novos alvos terapêuticos que se utilizem deste mecanismo de ação de modo a frear esta evolução dos quadros clínicos. Neste sentido, o uso de antioxidantes pode ser uma importante alternativa aos fármacos já utilizados para o THB, tanto minimizando os efeitos adversos associados a eles, como em relação às complicações relacionadas com esta condição neuropsiquiátrica.

Inflamação

O sistema imunológico é um sistema complexo de diversas estruturas e moléculas que são responsáveis pela proteção do organismo contra estímulos gerados a partir de um patógeno ou de uma situação patológica (ABBAS e LITCHMAN, 2008). A resposta do sistema imunológico frente a estas situações é chamada de processo inflamatório, que consiste em uma tentativa de combate à infecção ou ao dano que possa estar presente nos tecidos do organismo devido à patologia (MURPHY et al., 2010; BERK et al., 2011).

As citocinas inflamatórias são uma família de polipeptídeos produzidos a partir de diferentes células, entre elas as células do sistema imunológico, e são mediadores sistêmicos cruciais para uma resposta adequada do organismo frente a infecções e processos inflamatórios, através da ativação de receptores específicos (KUNZ et al., 2014; ALTAMURA et al., 2014). As interleucinas são um grupo de citocinas liberadas pelas células imunológicas que possuem diferentes funções nos processos inflamatórios (ABBAS e LITCHMAN, 2008).

A Interleucina 6 (IL-6) é considerada uma citocina pró-inflamatória, porque apresenta um efeito local muito importante na ativação de linfócitos e produção de anticorpos, ambos responsáveis pela imunidade adaptativa. Além disso, a IL-6 também possui efeitos sistêmicos, como a indução de febre e produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C – reativa (PCR). Já a Interleucina 10 (IL-10) possui efeitos anti-inflamatórios, uma vez que apresenta efeitos inibitórios da ativação de células T adjacentes e também da liberação de citocinas a partir de macrófagos (MURPHY et al., 2010; BERK et al., 2011). Além destas duas, existem outros diversos mediadores, com efeitos pró-inflamatórios – como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 8 (IL-8) e interferon- γ (IFN- γ) – e com efeitos anti-inflamatórios – como interleucina 4 (IL-4) e fator de transformação e crescimento- β (TGF- β) (BERK et al., 2011; MUNEER, 2016).

Diversos estudos na literatura evidenciam a presença de uma relação entre os processos inflamatórios no encéfalo (neuroinflamação) e também nos órgãos periféricos, com a fisiopatologia e neuroprogressão de diversas

doenças que afetam o SNC, entre elas o THB (BERK et al., 2011). Esta afirmação é evidenciada pelas altas taxas de comorbidades associadas ao transtorno, principalmente envolvendo mortalidade prematura por complicações cardiovasculares, como a aterosclerose, que podem estar relacionadas ao aumento de processos inflamatórios em pacientes com THB (OZDEMIRCAN et al., 2015; MUNEER, 2016). Neste sentido, o processo inflamatório, juntamente com o estresse oxidativo, parece ter um papel chave no desenvolvimento do THB (KUNZ et al., 2010).

De fato, há um crescente volume de dados demonstrando a presença de inflamação crônica em pacientes com THB, baseado no aumento dos níveis de mediadores inflamatórios encontrados tanto no SNC como em tecidos periféricos (BARBOSA et al., 2014; NASSAR e AZAB, 2014). Elevadas taxas de citocinas pró-inflamatórias estão associadas a episódios maníacos e depressivos, em relação às observadas em pacientes eutímicos (BERK et al., 2011; RODA et al., 2015). Em vista deste potencial papel da inflamação na fisiopatologia do THB, tem sido sugerido que a análise dos níveis de citocinas e outros mediadores inflamatórios a partir de amostras periféricas de fácil obtenção, como o soro e plasma sanguíneo, sejam aplicadas como marcadores biológicos para o diagnóstico mais eficaz e como possível alvo terapêutico (KAPCZINSKI et al., 2011; RODA et al., 2015).

Os dados mais consistentemente descritos na literatura demonstram o aumento dos níveis da IL-6 em soro de pacientes principalmente durante episódios maníacos, inclusive sendo sugerido por alguns autores como um possível marcador para estes estados (KAPCZINSKI et al., 2011; RODA et al., 2015; MUNEER, 2016). Já quanto aos níveis de IL-10, alguns estudos trazem uma diminuição desta citocina anti-inflamatória somente em pacientes em estágio mais avançado do transtorno, não sendo observadas alterações em pacientes recém-diagnosticados (RODA et al., 2015). Além disso, podem ser encontrados níveis elevados de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β e TNF α (BERK et al., 2011; RODA et al., 2015). O aumento nos níveis destes mediadores, principalmente a IL-6, contribui também para o aumento nos níveis de PCR, portanto sendo possível observar um estado pró-inflamatório característico na fase maníaca do THB (BAUER et al., 2014).

As citocinas inflamatórias periféricas não possuem a capacidade de permear a barreira hematoencefálica, entretanto podem atingir o SNC através de vias alternativas: através de áreas não protegidas pela barreira hematoencefálica, como os órgãos circunventriculares; da ativação de vias aferentes vagais; o transporte ativo por meio da barreira; o acesso das células imunes periféricas ao SNC e consequente secreção de citocinas por elas; ou a secreção de mediadores inflamatórios pelas próprias células endoteliais que constituem a barreira hematoencefálica (ALTAMURA et al., 2014; MUNEER, 2016).

Mirtilo e suas propriedades terapêuticas

Atualmente a busca por uma alimentação mais saudável tem se tornado cada vez mais comum, através do consumo de alimentos funcionais, como vegetais e frutas. A alimentação nutracêutica, como é definida a suplementação da dieta com fitonutrientes, apresenta diversos benefícios à saúde, além de auxiliar na prevenção e/ou tratamento de patologias (PENG et al., 2014). Isto se dá devido à presença de compostos bioativos nestes alimentos, que possuem diferentes propriedades bioquímicas com potencial terapêutico (SUBASH et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

O mirtilo, também conhecido no inglês como *blueberry*, é uma fruta originária da América do Norte, pertencente ao gênero *Vaccinium* e da família *Ericaceae*, (SKROVANKOVA et al., 2015). A produção mundial da fruta ocorre em sua maioria nos Estados Unidos e no Canadá, onde é amplamente consumida, e recentemente o Brasil vem demonstrando interesse em seu cultivo, principalmente no sul e no sudeste do país (RODRIGUES et al., 2011). O mirtilo é classificado como um tipo de *Berry*, juntamente com o morango, cereja, framboesa, amora, groselha e uva, por apresentar tamanho pequeno arredondado e sabor doce-ácido (MANGANARIS et al., 2013). Quando maduro, apresenta coloração azul arroxeada e peso entre 1,5 e 4g, dependendo do cultivar (FACHINELLO, 2008).

Todas as plantas, incluindo as frutíferas, produzem metabólitos que necessariamente não são essenciais ao seu metabolismo próprio, porém

apresentam uma variedade de funções envolvidas com a sua sobrevivência. Estes metabólitos são chamados de secundários, e são as principais moléculas responsáveis pelos efeitos benéficos atribuídos às plantas (JOSEPH et al., 2009). No caso do mirtilo, os principais metabólitos secundários produzidos são os compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides e principalmente as antocianinas. A estes compostos são atribuídas diversas propriedades terapêuticas, como o potencial antioxidante (JESUS, 2013; DIACONEASA et al., 2015).

As antocianinas são os compostos fenólicos mais abundantemente encontrados no mirtilo, e cerca de 80% da capacidade antioxidante da fruta é derivada destas moléculas (SKROVANKOVA et al., 2015; PENG et al., 2014). Além de antocianinas, o mirtilo também apresenta diversos outros compostos fenólicos, além de vitaminas, como o ácido ascórbico, responsável por cerca de 10% do potencial antioxidante (SKROVANKOVA et al., 2015). Neste sentido, o sinergismo entre estes variados compostos bioativos encontrados no fruto é também uma característica importante responsável pelo seu potencial antioxidante e consequente benefício à saúde.

Entre as frutas *Berries*, o mirtilo é a que apresenta a maior variedade de antocianinas, e esta abundância pode explicar o fato de que a fruta é considerada uma das frutas com maior capacidade antioxidante (PRIOR et al., 1998; RODRIGUES et al., 2011; SKROVANKOVA et al., 2015). A concentração de antocianinas no mirtilo é dependente de diversos fatores, como o tipo de cultivar e a localização do plantio, as técnicas e condições de cultivo, além do processamento e estocagem da fruta (FACHINELLO, 2008; SKROVANKOVA et al., 2015). Porém alguns estudos já demonstraram que o potencial antioxidante das frutas produzidas no território brasileiro é muito semelhante às produções já bem estabelecidas na América do Norte (FACHINELLO, 2008; RODRIGUES et al., 2011; PERTUZATTI et al., 2014).

As propriedades antioxidantes das antocianinas são derivadas da sua capacidade de funcionar como um *scavenger* de ROS, devido a sua estrutura fenólica. Estas moléculas possuem a capacidade de doar elétrons a fim de emparelhar os radicais livres, e assim neutralizá-los (PENG et al., 2014;

SKROVANKOVA et al., 2015). Porém, são atribuídas ao mirtilo e às antocianinas outras potentes propriedades terapêuticas, como o caráter anti-inflamatório (SHUKITT-HALE et al., 2005) neuroprotetor (WANG, 2013; CARVALHO et al., 2015) e antinociceptivo (TORRI et al., 2007; RAMIREZ et al., 2010).

Neste sentido, estudos demonstram o papel farmacológico do mirtilo em diversas situações patológicas, como desordens oftalmológicas (catarata e degeneração macular) (SKROVANKOVA et al., 2015), atividades anti-hiperlipidêmicas e hipoglicemiantes (MARY et al., 2009; ÇOBAN et al., 2013), na prevenção de doenças vasculares (ERLUND et al., 2008) e inibição da proliferação de células tumorais e angiogênese (DIACONEASA et al., 2015; BAGCHI et al., 2004).

Diversos estudos tem relacionado a suplementação da dieta com o mirtilo e outros tipos de *berries* com a prevenção e tratamento de patologias e alterações de comportamento relacionadas ao envelhecimento e a doenças neurodegenerativas (SHUKITT-HALE et al., 2005; SUBASH et al., 2014). Uma vez que a neuroinflamação e a produção intensa de ROS apresentam um papel chave para o desenvolvimento e neuroprogressão de doenças no SNC, as antocianinas presentes no mirtilo com potencial antioxidante já comprovado podem estar associadas também a efeitos neuroprotetores (PENG et al., 2014). Estes efeitos ocorrem devido à capacidade da molécula de permear a barreira hemato-encefálica, e assim reduzir os efeitos das ROS diretamente em tecidos específicos no cérebro (ZEPEDA et al., 2012; SUBASH et al., 2014).

Estudos demonstram que a suplementação com o mirtilo na dieta pode elevar a cognição e o funcionamento motor de ratos em idade avançada, aumentando o seu desempenho em testes de reconhecimento de objetos e de avaliação da locomoção e coordenação motora (JOSEPH et al., 2009). Testes *in vitro* utilizando cultivos celulares de neurônios apresentando acúmulo de proteínas amiloides, proteínas relacionadas com a perda de memória e desenvolvimento do *Alzheimer*, apresentaram efeito neuroprotetor a partir do tratamento com o extrato de mirtilo, tanto em cultivos de neurônios de ratos adultos como em idade avançada. Este efeito é explicado pelo aumento da

expressão de glutathiona, molécula que apresenta potentes efeitos antioxidantes, e assim é capaz de proteger as células dos efeitos deletérios das ROS (BREWER et al., 2010). Além disso, outros estudos também demonstraram o potencial antioxidante de extratos de mirtilo na *upregulation* da expressão de SOD e CAT, em modelos utilizando *Drosophila melanogaster* (PENG, et al., 2012).

Dados na literatura também trazem que o tratamento via oral com antocianinas na concentração de 200mg/kg demonstrou ser capaz de aumentar o desempenho de memória em um modelo animal de *Alzheimer* (GUTIERRES et al., 2014). O consumo de suco de mirtilo diariamente por 12 semanas também já foi relacionado ao aumento do desempenho de memória em adultos idosos com declínio de memória (KRIKORIAN et al., 2010). Em adição a isto, já foram observados efeitos promissores no tratamento de doenças psiquiátricas, como a depressão, com dados demonstrando potenciais efeitos antidepressivos relacionados ao tratamento com antocianinas (NABAVI et al., 2015).

Neste sentido, as terapias à base de plantas podem ser alternativas eficazes no tratamento do THB porque os estabilizadores de humor utilizados como preferência – o carbonato de lítio especialmente – apresentam diversos efeitos adversos, o que limitam a sua tolerabilidade, dificultando a adesão do paciente ao tratamento, e ao fim uma maior taxa de recaídas e novos episódios (CASTRO-COSTA e SILVA, 2011). Uma vez demonstrada atividade antioxidante e prevenção na alteração de diversos mecanismos de sinalização celular envolvendo diversas patologias, inclusive de ordem psiquiátrica, torna-se necessário avaliar o efeito do tratamento preventivo com o extrato de mirtilo em um modelo experimental de mania.

4. Manuscrito

Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine

Gabriela Debom¹, Marta Gazal^{2*}, Mayara Sandrielly Pereira Soares¹, Carlus Augustu Tavares do Couto¹, Bruna Mattos¹, Claiton Lencina³, Manuella Pinto Kaster⁵, Gabriele Codenonzi Ghisleni⁶, Rejane Tavares⁴, Elizandra Braganhol⁷, Francieli Stefanello⁴, Roselia Maria Spanevello¹

O manuscrito está formatado de acordo com as normas da revista a qual foi submetido, Brain Research Bulletin

Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine

Gabriela Debom¹, Marta Gazal^{2*}, Mayara Sandrielly Pereira Soares¹, Carlus Augustu Tavares do Couto¹, Bruna Mattos¹, Claiton Lencina³, Manuella Pinto Kaster⁵, Gabriele Codenonzi Ghisleni⁶, Rejane Tavares⁴, Elizandra Braganhol⁷, Francieli Stefanello⁴, Roselia Maria Spanevello¹

¹ Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

² Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Curso de Farmácia, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil

⁴ Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

⁵ Programa de Pós Graduação em Bioquímica - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁶ Programa de Pós Graduação em Saúde e Comportamento - Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

⁷ Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Address reprint requests to: Roselia Maria Spanevello (rspanevello@gmail.com)

Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, Cep: 96010-900
Phone: 55 53 32757355 Fax: 55 53 32757354

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the protective effects of blueberry extract on oxidative stress and inflammatory parameters in a model of mania induced by ketamine administration in rats. Male rats were pretreated with blueberry extract (200 mg/kg, once a day for 14 days) lithium chloride (45 mg/kg, mood stabilizer used as a positive control, twice a day for 14 days), or vehicle. Between the 8th and 14th days, rats also received an injection of ketamine (25 mg/kg) or vehicle. In the 15th day, thirty minutes after ketamine administration the hyperlocomotion of the animals was assessed in the open - field apparatus. Immediately after the behavioral analysis brain and blood were collected for biochemical determinations. Our results showed that ketamine induced hyperlocomotion and oxidative damage in cerebral cortex, hippocampus and striatum evaluated by increase in lipid peroxidation, decreased in total thiol content and decreased in the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Ketamine administration also increased the IL-6 levels in serum in rats. Pretreatment of rats with blueberry extract or lithium prevented the hyperlocomotion, pro - oxidant effects and inflammation induced by ketamine. Our findings suggest that blueberry consumption has a neuroprotective potential against behavioral and biochemical dysfunctions induced in a preclinical model that mimic some aspects of the manic behavior.

Keywords: Blueberry, Oxidative stress, Cytokines, Ketamine, Hyperlocomotion

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a chronic, severe and prevalent mental disorder associated with high rates of non-recovery, recurrence, and chronicity (Munner, 2016b). BD is one of the leading causes of disability among individuals with medical and psychiatric conditions, affecting 1% to 5% of the world population, and it is associated with substantial morbidity and mortality (Young and Dulcis, 2015). Moreover, for many affected individuals, BD is a progressive and accelerating condition associated with neurostructural changes and cognitive deterioration (Angst et al., 2002; Ketter et al., 2010).

The pathophysiological mechanisms underlying BD are still unknown and include genetic factors, neuroinflammation and neurodegeneration (Andreazza et al., 2008; Martinowich et al., 2009). In this context, oxidative stress and inflammation seem to play important role triggering cellular process associated with the development and progression of psychiatric disorders, including BD (Kapczinski et al., 2011, Berk et al., 2011 Siwek et al., 2013; Bauer et al., 2014; Selek et al., 2015).

Oxidative stress occurs when there is an imbalance between pro-oxidant levels and antioxidant capacity (Jones, 2008). This condition can contribute to damage in cellular components, such as proteins, lipids and DNA, leading to apoptosis and cell death (Finkel and Holbrook, 2000; Jones, 2008).

The brain is especially vulnerable to the effects of oxidative stress because of its high oxygen demand and its high amounts lipids susceptible to peroxidation (Salim, 2014; Kim et al., 2015). In this line, oxidative stress is thought to mediate neuropathological processes associated with progression of BD (Selek et al., 2015). In addition, several pieces of evidences demonstrated increased pro inflammatory mediators, such as interleukin 6 (IL- 6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) in BD, suggesting that activation in inflammatory pathways is also involved in this pathology (Modabbernia et al., 2013; Bauer et al., 2014; Selek et al., 2015).

Mood stabilizers such as lithium represent the first line of treatment during a manic episode. However, many BD patients do not adequately respond

to pharmacological treatment and frequently present some side effects that contribute to reduce the patients' quality of life (Budni, 2013). Therefore, it is important to search for new therapeutic approaches that represent alternative strategies to manage the manic episodes associated with BD. In fact, there is a growing interest in the use of natural compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties such as polyphenol-rich fruit extracts (Krikorian et al., 2010; Jeong et al., 2013).

Blueberries are plants belonging to genus *Vaccinium* of the family *Ericaceae* (Wang et al., 2013). The fruit has a dark color due to the presence of anthocyanins as principal pigment (Zepeda et al., 2012). Studies have described a wide range of biological properties and several health benefits might be associated with the consumption of blueberry, such as high antioxidant capacity, anti-inflammatory, immune-regulatory and neuroprotective properties (Wang, 2013; Kšonžeková, 2015). Epidemiological studies have demonstrated the association between regular blueberry consumption and the clinical improvement in patients with neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's and Parkinson's disease (Gustafson et al., 2012). Nevertheless, the effects of the blueberry consumption in behavior associated with psychiatric disorders are not elucidated yet.

In this context, the aim of this study was to evaluate the neuroprotective effects of blueberry extract (*Vaccinium virgatum*) on oxidative stress parameters and peripheral inflammation in rats submitted to a model of manic-like behavior induced by ketamine.

2. Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (60 days old) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room. Rats had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animal procedures were approved by the Ethics Committee and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil under protocol number (CEEAA 9026).

Plant material, extract preparation and phytochemical determination

Extraction

Vaccinium virgatum fruits were harvested in the orchard at Federal University of Pelotas (31°48'12.48"S and 52°30'34.08"W). The extracts were prepared according to Bordignon et al. (2009) with modifications. Briefly, unprocessed frozen blueberry fruits (30 g) were sonicated for 30 min at 25°C in 90 mL 70:30 v/v ethanol-water. The pH solution was adjusted to 1.0. After this, the crude extracts were filtered; the ethanol evaporated under reduced pressure and the remaining aqueous solution was lyophilized yielding the test samples. These procedures were performed in triplicate and sheltered from light.

Total flavonoid content

The total flavonoid content in samples was determined according to Miliauskas et al. (2004) with minor modifications. The calibration curve was prepared by mixing aliquots of 1 mL of an ethanolic solution of rutin at concentrations of 100, 150, 200, 300, 450 and 500 µg/mL with 1 mL of an ethanolic solution of 20 g/L aluminum chloride and diluted to 25 mL of ethanol. The absorptions were measured at 415 nm after 40 min. These readings were used to draw the calibration curve. The absorption of each blueberry sample was measured under the same conditions. Data are mean ± SD values expressed as milligrams of rutin per 1 g of dried extract. All analyses were performed in triplicate.

Total phenolic content

The total phenolic content was determined according to Singleton et al. (1999) with slight modifications. The calibration curve was first prepared by mixing 125 µL aliquots of an ethanolic solution of gallic acid at concentrations of 100, 150, 200, 300, 450 and 500 µg/mL, 500 µL of distilled water and 125 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min 1.25 mL of a 7% solution of sodium carbonate was added and 1 mL of distilled water making a final volume of 3 mL. The readings were performed after 90 minutes on a wavelength of 760 nm. Data are mean ± SD values expressed as milligrams of gallic acid per 1 g of dried extract.

Total anthocyanin content

Anthocyanins were quantified by the differential pH method. Calculation of the anthocyanin concentration was based on cyanidin-3-glucoside in a molar extinction coefficient of 26,900 and molecular weight of 449.2 g/mol. Data are mean $\pm$ SD values expressed as milligrams of cyanidin-3-glucoside per 1 g of dried extract. All analyses were performed in triplicate.

LC/MS and anthocyanin identification

Anthocyanin profile analysis was performed by liquid chromatography (UPLC, Waters Acquity mode) coupled to high resolution mass spectrometry (Xevo G2 QTof model), equipped with an electrospray ionization source and controlled by MassLynx v.4.1 software. Separation was performed in a C18 column (100 x 2.1 mm - 1.7 μ M - Kinetix / Phenomenex) at 40 °C. The mobile phase consisted of a linear gradient of 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) using the range of 5% to 58% B over 8 minutes at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. A mass spectrum was obtained in positive mode, with a mass range of m/z of 100 to 1000. The capillary voltage used was 2.0 kV and the cone voltage of 50 V. Nebulization and desolvation were performed with nitrogen at 300 and flow 10 L h⁻¹. Desolvation and source temperature were respectively 300 °C and 120 °C.

Experimental protocol of mania state and treatment with blueberry extract

This study was designed to mimic the prevention protocol of the mania state as previously described in the literature (Ghedim et al., 2012; Gazal et al., 2014). The animals were divided into six groups: saline/saline, saline/ blueberry extract (200 mg/kg)/, saline/lithium chloride (45 mg/kg), ketamine/saline, ketamine/ blueberry extract (200 mg/kg), ketamine/ lithium chloride (45 mg/kg). The experimental groups were treated with blueberry extract 200 mg/kg (once a day) and lithium 45 mg/kg (twice a day) for 14 days by oral administration. From the 8th to the 14th day the animals also received saline or ketamine (25 mg/kg) once a day by intraperitoneal route administration. On the 15th day of treatment, the animals received a single injection of ketamine or saline and the locomotor activity was assessed in the open-field apparatus after 30 min (Figure 1). Ketamine, blueberry extracts and lithium chloride were dissolved in saline

solution (NaCl 0.9%). The doses of ketamine, lithium chloride and blueberry extract used in the present study were chosen according to the literature (Ghedim et al., 2012; Gazal et al., 2014; Gutierrez et al., 2014a).

Open-field test

Locomotor and anxiety-related behavior was monitored using an open-field apparatus, as previously described (Gazal et al., 2014). The apparatus consisted of a wooden box measuring 40 x 60 x 50 cm. The floor of the arena was divided into 12 equal squares and placed in a sound free room. Animals were placed in the rear left square and left to explore it freely for 5 min. The total number of squares crossed with all paws (crossing) was counted in order to evaluate the ambulatory behavior. The number of central crossings was the measure used to evaluate anxiety. The apparatus was cleaned with a 10% alcohol solution and dried after each individual animal session.

Determination of oxidative stress parameters in brain structures

Rats were submitted to euthanasia immediately after the open-field test. Cerebral cortex, hippocampus and striatum were homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 x *g* for 10 min at 4°C, the pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the oxidative stress measurements. The protein content was quantified by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

Thiobarbituric acid reactive species formation (TBARS)

The measure of lipid peroxidation was determined by TBARS in accordance with the protocol described by Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, homogenates were mixed with trichloroacetic acid 10% and thiobarbituric acid 0.67% and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS was determined by the absorbance at 535 nm. Results were reported as nmol of TBARS per mg of protein.

Total sulfhydryl content (SH content)

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001) which is based on the reduction of DTNB by thiols, which in turn,

becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, homogenates were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-*bis*(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were reported as μmol TNB per mg of protein.

Catalase (CAT) assay

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984). H_2O_2 disappearance was continuously monitored during 90 s in a spectrophotometer adjusted at 240 nm. CAT specific activity was reported as units of enzyme per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) assay

Total SOD activity was measured using the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted at 480 nm. The specific activity of SOD was reported as units per mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx)

GPx activity was measured according to the method described by Wendel (1981) using tert-butyl hydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was monitored spectrophotometrically at 340 nm in a medium containing 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GPx unit is defined as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as units/mg of protein.

Cytokine analysis

Serum levels of IL-6 and IL-10 were measured using Immunoassay kits (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

Statistical analysis

Comparisons between experimental groups were performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test. The values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Anthocyanin identification was based on fragmentation pattern and exact mass (Table 1). Five aglycone fragments, cyanidin (m/z 287.0552), peonidin (m/z 301.0711), delphinidin (m/z 303.0506), petunidin (m/z 317.0668) and malvidin (m/z 331.0814) were identified. Aglycone fragmentation pattern and exact mass allowed the identification of nine monoglucosylated anthocyanins.

Ketamine treatment induced hyperlocomotion in rats, which was evaluated by an increase in the number of crossings in the open field test (Figure 2). Pretreatment with blueberry extract or lithium prevented the hyperlocomotion induced by ketamine: (blueberry and lithium pretreatment: $[F(2,44)=7.18 \ P= 0.0020]$, ketamine treatment: $[F(1,44)=29.07 \ P= 0.0001]$, interaction: $[F(2,44)=3.32 \ P=0.0450]$ (Figure 2).

The results of oxidative stress parameters in cerebral cortex are demonstrated in Figure 3. Our results showed that treatment with ketamine caused an increase in the TBARS levels in cerebral cortex and pretreatment with blueberry extract or lithium was able to prevent this effect (ketamine treatment: $[F(2,26)=3.55 \ P= 0.0432]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(1,26)=4.28 \ P= 0.0485]$ interaction: $[F(2,26)=14.30 \ P<0.0001]$ (Figure 3A). Blueberry extract and lithium pretreatment also prevented the decrease in the total sulfhydryl content induced by ketamine in cerebral cortex (ketamine treatment: $[F(2,23)=5.46 \ P=0.0285]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(1,23)=11.4 \ P= 0.0004]$ interaction: $[F(2,23)=42.54 \ P<0.0001]$) (Figure 3B). In relation to antioxidant enzymes we observed a decrease in the SOD and CAT activities in cerebral cortex of rats treated with ketamine. In addition, blueberry and lithium were capable of preventing this effect: (SOD: ketamine treatment: $[F(2,23)=12.14 \ P=0.0022]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(1,23)= 26.50$

$P=0.0001$] interaction: $[F(2,23)=17.83\ P<0.0001]$) (Figure 3C), (CAT: ketamine treatment: $[F(2,23)=5.71\ P=0.0258]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(1,23)=3.79\ P=0.0385]$ interaction: $[F(2,23)=6.92\ P<0.0047]$) (Figure 3D). No changes were observed in the activity of GPx in cerebral cortex in all groups evaluated in this study (Figure 3E).

Figure 4 shows that blueberry extract or lithium treatment also was capable of preventing the increase in TBARS levels and the decrease in the activities of SOD and CAT enzymes induced by ketamine in hippocampus: (TBARS: ketamine treatment: $[F(1,24)=38.86\ P<0.0001]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(2,24)=5.79\ P=0.0088]$, interaction: $[F(2,24)=18.74\ P<0.0001]$) (Figure 4A), (SOD: ketamine treatment: $[F(1,24)=5.18\ P<0.0332]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(2,24)=19.87\ P=0.0032]$, interaction: $[F(2,24)=40.00\ P<0.0001]$) (Figure 4C), (CAT: ketamine treatment: $[F(1,24)=4.40\ P<0.045]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(2,24)=7.50\ P=0.0023]$, interaction: $[F(2,24)=15.52\ P<0.0001]$) (Figure 4D). No changes were observed in the levels of total sulfhydryl content and activity of GPx in hippocampus in all groups evaluated in this study (Figure 4B and E).

As demonstrated in Figure 5A blueberry extract and lithium pretreatment prevent the increase in TBARS levels induced by ketamine in striatum: (ketamine treatment: $[F(1,18)=10.98\ P<0.0362]$, blueberry and lithium pretreatment: $[F(2,18)=10.30\ P=0.0010]$, interaction: $[F(2,18)=4.01\ P<0.0362]$) (Figure 5A). The treatment with ketamine induced a decrease in GPX activity and blueberry treatment prevented this effect: (ketamine treatment: $[F(1,18)=8.81\ P<0.00082]$, blueberry pretreatment: $[F(2,18)=4.29\ P=0.0299]$, interaction: $[F(2,18)=5.59\ P<0.0001]$) (Figure 5E). As demonstrated in figure 5 B, C and D, no changes were observed in the levels of total sulfhydryl content and activity of SOD and CAT enzymes in striatum in all groups of this study (Figure 5B, C and D).

In this study we also evaluated the effects of blueberry extract and lithium on inflammatory parameters such as IL-6 and IL-10 levels in a ketamine - induced model of mania. Our results showed that ketamine induced an increase in serum IL-6 levels and that only lithium treatment was capable of preventing this alteration: (ketamine treatment: $[F(1,18)=5.48\ P<0.0001]$, lithium pretreatment: $[F(2,18)=9.95\ P=0.0014]$, interaction: $[F(2,18)=27.04\ P=$

0.0316]) (Figure 6A). No changes were observed in the IL-10 levels in serum in any of the groups evaluated in this study (Figure 6B).

4. Discussion

In the present study we evaluated the effects of blueberry extract in an experimental model of manic-like behavior induced by ketamine administration in rats. Ketamine is a psychotomimetic compound also used as an anesthetic drug. In sub anesthetic doses ketamine is able to induce different effects on mood and behavior, ranging from a fast antidepressant effect (in lower doses) to induction of hyperlocomotion and manic-like behavior (in higher sub anesthetic doses) (Ghedim et al., 2012). Ketamine is a pharmacological antagonist of NMDA glutamate receptors, and represents a valid model of manic-like behavior because this model produces behavioral and biochemical alterations similar to those found in BD (Ghedim et al., 2012; Fraga et al., 2013). In addition, the administration of clinically effective mood stabilizers, is capable to prevent or revert these alterations. The hyperactivity can be viewed as manic-like behavior because this symptom is very common in patients in the manic phase of BD (Henry et al., 2010).

Our findings showed that ketamine administration induced hyperlocomotion and changes in some brain oxidative stress parameters such as the increase in TBARS levels, decrease in the total thiol content in cerebral cortex and decrease in the activities of antioxidant enzymes SOD and CAT (cerebral cortex and hippocampus) and GPX (striatum). Similar results were described in other studies with experimental models of mania (Jornada et al., 2011; Gazal et al., 2014). In addition, the literature has consistently reported increased products of lipid peroxidation and alterations in antioxidant enzymes in BD patients (Ranjekar et al., 2003; Machado-Vieira et al., 2007; Andreazza et al., 2008; Kapczinski et al., 2011).

Lipid peroxidation is the one of the main events induced by oxidative stress in which reactive species interact with polyunsaturated fatty acids (Ayala et al., 2014). Oxidation products may induce damage to cellular membrane components, alterations in the biochemical properties of biomolecules, cell necrosis and inflammation (Leutner et al., 2001; Stark, 2005; Montine et al., 2002; Rawdin et al., 2013; Ayala et al., 2014). Antioxidant enzymes such as

SOD, CAT and GPx have a crucial role in the scavenging free radicals. CAT and SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) in hydrogen peroxide (H_2O_2) which is sequentially degraded by CAT and GPx enzymes (Pisoschi and Pop, 2015). A decrease in the activity of SOD, CAT and GPx enzymes may lead to an excess of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 which in turn generates hydroxyl radicals, resulting in initiation and propagation of lipid peroxidation (Matés et al., 1999; Leutner et al., 2001; Pisoschi and Pop, 2015). The results of this study suggest that the imbalance in antioxidant defenses probably alters reactive species elimination increasing the amount of free radicals. In this line, it is plausible to suggest that the oxidative stress is associated with changes in brain structures involved in mood and emotional regulation during the manic phase of BD.

Corroborating this hypothesis, data from literature have demonstrated alterations in hippocampus and cerebral cortex in BD such as reduction of synapsin (Vawter et al., 2002), decreased hippocampal NMDA receptors (Scarr et al., 2003), decreased cortical thickness (Lyoo et al., 2006) and reduced miRNA expression levels (Moreau et al., 2011). These two structures have been associated with a progressive decline of density and volume in patients with multiple mood episodes (Strakowski et al., 2002; Roda et al., 2015). In addition, striatum dysfunctions also have often been suggested due to its functional importance as a relay station integrating information between cortical areas and the thalamus (Kristansen and Meador-Woodruff, 2005; Marchand and Yugerlun-Todd, 2010). In fact, our findings suggest that oxidative stress might mediate the neuropathological process involved in etiology and progression of BD.

The main finding of this study was the ability of blueberry extract to prevent hyperlocomotion and changes in oxidative stress parameters induced by ketamine in rats. These results are consistent with other experimental conditions, where blueberry treatment improved antioxidant defenses and decreased oxidant agents in brain regions (Papandreou et al., 2009, Pang et al., 2010, Çoban et al., 2015; Carvalho et al., 2015; 2016).

Blueberries are the fruits that contain several polyphenolic compounds such as flavonoids, nonflavonoids and phenolic acids. Anthocyanins, a subset of flavonoids, are particularly abundant and play an important role in the

protective effect of blueberries. In fact, the antioxidant effects of anthocyanins has been attributed to their metal chelating activities (Han et al., 2015), modulation of antioxidant enzymes (Carvalho et al., 2015), capacity to scavenge free radicals (Peng et al., 2014) and ability to decrease the activation of nuclear factor NF- κ B (Karlsen et al., 2007). The neuroprotective effect of anthocyanins can be related also to this capacity to cross the blood-brain barrier acting in specific regions of the brain (Zepeda et al., 2012; Subash et al., 2014). Previous studies from our research group have demonstrated that anthocyanin-rich extract prevented impairment of memory and anxiogenic behavior in an experimental model of Alzheimer (Gutierrez et al.; 2014). In addition, it has been demonstrated that anthocyanins have affinity for GABA_A receptors, since they are capable to displace the specific binding of [³H]flunitrazepam to benzodiazepinic site of these receptors (Gutierrez et al., 2014a). Anthocyanin treatment can also regulate ion pump activity, cholinergic neurotransmission (Gutierrez et al., 2014 a, b), attenuate the generation of ROS, reduce the production of proinflammatory cytokines and prevent the increase of myeloperoxidase activity in the brain (Carvalho et al., 2015). Moreover, another study demonstrated that anthocyanins prevented infiltration of peripheral immune cells in the hippocampus and reduced microglia (Iba-1) and astrocyte (GFAP) immunoreactivity after lipopolysaccharide administration in mice (Carvalho et al., 2016).

Considering that several polyphenolic compounds present in blueberry extract, especially anthocyanins, have many cellular targets, blueberry is a promising neuroprotective compound that might be useful against brain dysfunctions associated with BD, especially during the manic episode. Although we cannot precisely explain the mechanisms involved in the effect of blueberry in ketamine - induced hyperlocomotion, there is a strong possibility that blueberry and lithium might share some of the intracellular targets to exert their antimaniac effects. However, is important to note that this antimaniac effect of blueberry can be associated with antioxidant effects observed in this study.

Another important aspect to be discussed is that similar results were observed between blueberry and lithium treatment in oxidative stress parameters in hippocampus and cerebral cortex. Lithium is recommended as a

first – line treatment for bipolar disorders. This drug is a gold standard mood stabilizing agent that has been found to prevent and/or reverse the oxidative stress parameters in experimental models and in BD patients (Jornada et al., 2011; Banerjee et al., 2012; Sousa et al., 2014; Gazal et al., 2014). However, lithium treatment has also been associated with several side effects (Honing et al., 1999; Henry, 2002). In this line we can suggest that blueberry consumption is a natural and promising compound that should be better investigated in future studies with the aim of finding better therapeutical agent to benefit patients with bipolar disorders in manic phase.

In this study we also showed increase in serum IL- 6 levels in rats after ketamine administration. Several studies have reported increased levels of circulating proinflammatory cytokines in different phases of BD (Muneer, 2016 a). Increased levels of IL-6 have been consistently described in manic episodes (Kapczinski et al., 2010; Kunz et al., 2011; Ozdemircan et al., 2015). Inflammation and oxidative stress are connected in both physiological as well as in pathological conditions. In fact, data from literature have reported that ROS production stimulates the synthesis and release of IL-6 by activation of transcriptional factors through the NF- κ B dependent pathway (Kosmidou et al., 2002). Our findings are consistent with the hypothesis that mechanisms regulating inflammation and oxidation are dysregulated in the manic phase of BD. Indeed, several studies demonstrated a connection between oxidative stress, proinflammatory conditions and neuroprogression of BD, leading to brain dysfunctions associated to increase in symptoms' severity and higher number of episodes over the course of disease (Berk et al., 2011; Bauer et al., 2014).

Lithium pretreatment was capable to prevent the alterations in IL-6 levels induced by ketamine. These results are in accordance with the literature data, showing that decreased levels of this cytokine are associated with lithium therapy in BD patients (Boufidou et al., 2004; Kim et al., 2007; Brietzke et al., 2009). The action mechanisms underlying the efficacy of lithium have not been completely elucidated, and some authors have suggested that this mood stabilizer also plays a role in inflammatory pathways, attenuating IL-6 production (Nassar and Azab, 2014). Even though blueberry has been associated with anti-inflammatory properties in others studies, we did not observe any significant differences in the levels of IL-6 induced by ketamine.

The peripheral levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were changed neither by ketamine nor by blueberry treatment.

Our findings support the hypothesis that oxidative stress and increased levels of IL-6 might contribute for brain and behavioral dysfunctions associated with bipolar disorder during manic episodes. Blueberry prevented hyperlocomotion and changes in oxidative stress parameters induced by ketamine. These results are very important from the translational point of view because they reinforce the benefits of natural compounds to the health, in special in the progression and complications associated to manic phase in BD.

Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We are grateful to Dr. Marcia Wulff Schuch (Department of Plant Science/UFPel) for providing fresh fruits.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, n.1, p.121-126, 1984.

Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v.302, n.1, p.141-145, 2001, doi: 10.1016/S0304-3940(01)01636-6.

Andreazza, A.C.; kauer-sant'anna M.; Frey, B.N.; Bond, D.J.; Kapczinski, F.; YOUNG, L.T.; YATHAM, L.N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, v.111, n.1, p.135-144, 2008, doi: 10.1016/j.jad.2008.04.013.

Angst, J.; Gamma, A.; Lewinsohn, P. The evolving epidemiology of bipolar disorder. *World Psychiatry*, v.1, n.3, p.146-148, 2002.

Ayala, A.; Munõz, M.; Arguelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2014, n.1, p. 1-31, 2014, doi: 10.1155/2014/360438.

Banerjee, U.; Dasgupta, A.; Rout, J.; Singh, O. Effects of lithium therapy and Na⁺ K⁺ ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.37, n.1, p.56-61, 2012, doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.12.006.

Bauer, J.; Pascoe, M.; Wollenhaupt-Aguiar, B.; Kapczenski, F.; Soares, J. Inflammatory mediators of cognitive impairment in bipolar disorders. *Journal of Psychiatric Research*, v.56, n.1, p.18-27, 2014, doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.04.017.

Berk, M.; Kapczinski, F.; Andreazza, A.C.; Dean, O.M.; Giorlando, F.; Maes, M.; Yucel, M.; Gama, C.S.; Dodd, S.; Dean, B.; Magalhães, P.V.S.; Amminger, P.; McGorry, P.; Malhi, G.S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.35, n.1, p.804-817, 2011, doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.10.001.

Bordignon JR, C.L.; Francescato, V.; Nienow, A.A.; Cavete, E.; Reginatto, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.1, p.183-188, 2009, doi: 10.1590/S0101-20612009000100028.

Boufidou, F.; Nikolaou, C.; Alezivos, B.; Liappas, I.; Christodoulou, G. Cytokine production in bipolar affective disorder patients under lithium treatment. *Journal*

of affective disorders, v.82, n.1, p.309-313, 2004, doi: 10.1016/j.jad.2004.01.007.

Brietzke, E.; Kauer-Sant'anna, M.; Teixeira, A.L.; Kapczinski, F. Abnormalities in serum chemokine levels in euthymic patients with bipolar disorder. *Brain, Behavior and Immunity*, v.23, n.8, p.1079-1082, 2009, doi: 10.1016/j.bbi.2009.04.008.

Budni, J.; Valvassori, S.S.; Quevedo, J. Biological mechanisms underlying neuroprogression in bipolar disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, Rio de Janeiro, v.35, n.1, p.1-2, 2013, doi: 10.1016/j.rbp.2013.01.001.

Carvalho, F.; Gutierrez, J.; Bohnert, C.; Zago, A.; Abdalla, F.; Vieira, J.; Palma, H.; Oliveira, S.; Spanevello, R.; Duarte, M.; Lopes, S.; Aiello, G. Amaral, M.; Pippi, N.; Andrade, C. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.26, n.1, p.378-390, 2015, doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.11.006.

Carvalho, F.B.; Gutierrez, J.M.; Bueno, A.; Agostinho, P.; Zago, A.M.; Vieira, J.; Frühauf, P.; Cechella, J.L.; Nogueira, C.W.; Oliveira, S.M.; Rizzi, C.; Spanevello, R.M.; Duarte, M.M.; Duarte, T.; Dellagostin, O.A.; Andrade, CM. Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. *Molecular Neurobiology*, 2016 (in press).

Çoban, J.; Evran, B.; Ozkan, F.; Çevik, A.; Dooru-Abbasoolu, S.; Uysal, M. Effect of blueberry feeding on lipids and oxidative stress in the serum, liver and aorta of guinea pigs on a high-cholesterol diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.77, n.2, p.389-391, 2013, doi: 10.1271/bbb.120722.

Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, v.186, n.1, p.407-421, 1990, doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-H.

Finkel, T.; Holbrook, N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v.408, n.1, p.339-347, 2000, doi: 10.1038/35041687.

Fraga, D.B.; Réus, G.Z.; Abelaira, H.M.; DE Luca, R.D.; Canevar, L.; Pfaffenseller, B.; Colpo, G.D.; Kapczinski, F.; Quevedo, J.; Zugno, A.I. Ketamine alters behavior and decreases BDNF levels in the rat brain as a function of time after drug administration. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.35, n.3, p.262-266, 2013, doi: 10.1590/1516-4446-2012-0858.

Gazal, M.; Valente, M.R.; Acosta, B.A.; Kaufmann, F.N.; Braganhol, E.; Lencina, C.L.; Stefanello, F.M.; Ghisleni, G.; Kaster, M.P. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.724, n.1, p.132-139, 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2013.12.028.

Ghedim, F.V.; Fraga, D.B.; Deroza, P.F.; Oliveira, M.B.; Valvassori, S.S.; Steckert, A.V.; Budni, J.; Dal-Pizzol, F.; Quevedo, J.; Zugno, A.I. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: Implications as an animal model of mania. *Journal of Psychiatric Research*, v.46, n.1, p.1569-1575, 2012, doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.08.010.

Gustafson, S.J.; Dunlap, K.L.; McGill, C.M.; Kuhn, T.B. A nonpolar blueberry fraction blunts NADPH oxidase activation in neuronal cells exposed to tumor necrosis factor- α . *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2012, n.1, p. 1-12, 2012, doi: 10.1155/2012/768101.

Gutierrez^a, J.M.; Carvalho, F.B.; Schetinger, M.R.C.; Marisco, P.; Agostinho, P.; Rodrigues, M.; Rubin, M.A.; Schmatz, R.; Silva, C.R.; Cognato, G.P.; Farias, J.G.; Signor, C.; Morsch, V.M.; Mazzanti, C.M.; Bogo, M.; Bonan, C.D.; Spanevello, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by atreptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sciences*, v.96, n.1, p.7-17, 2014, doi: 10.1016/j.lfs.2013.11.014.

Gutierrez^b, J.M.; Carvalho, F.B.; Schetinger, M.R.; Agostinho, P.; Marisco, P.C.; Vieira, J.M.; Rosa, M.M.; Bohnert, C.; Rubin, M.A.; Morsch, V.M.; Spanevello, R.; Mazzanti C. M. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 33, p.88-97, 2014. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013

Han, K.; Kitano-Okada, T.; Seo, J.; Kim, S.; Saski, K.; Shimada, K.; Fukushima, M. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins of adzuki bean extracts and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, v.14, n.1, p.692-701, 2015, doi: 10.1016/j.jff.2015.02.018.

Henry, B.L.; Minassian, A.; Young, J.W.; Paulus, M.P.; Geyer, M.A.; Perry, W. Cross-species assessments of motor and exploratory behavior related to bipolar disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.34, n.8, p.1296-1306, 2010, doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.002.

Henry, C. Lithium side-effects and predictors of hypothyroidism in patients with bipolar disorder: sex differences. *Journal of Psychiatry Neuroscienc*, v.27, n.2, p.104-107, 2002.

Honig, A.; Arts, B.M.G.; Ponds, R.W.H.M.; Riedel, W.J. Lithium induced cognitive side-effects in bipolar disorder: a qualitative analysis and implications for daily practice. *International Clinical Psychopharmacology*, v.14, n.3, p.167-171, 1999.

Jeong, H.; JO, Y.; Jeong, J.; Kim, H.; Kim, M.; Heo, H. Blueberry (*Vaccinium virgatum*) leaf extract protect against Ab-Induced cytotoxicity and cognitive impairment. *Journal of Medical Food*, v.16, n.1, p.968-976, 2013, doi: 10.1089/jmf.2013.2881.

Jones, D. Radical free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology*, v.295, n.1, p.849-868, 2008, doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008.

Jornada, L.; Valvassore, S.; SteckerT, A.; Moretti, M.; Mina, F.; Ferreira, C.; Arent, C.; Dal'Pizzol, F.; Quevedo, J. Lithium and valproate modulate the antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative stress in an animal model of mania. *Journal of Psychiatric Research*, v.45, n.1, p.162-168, 2011, doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.05.011..

Kapczinski, F.; Dal-Pizzol, F.; Teixeira, A.L.; Magalhaes, P.V.; Kauer-Sant'anna, M.; Klamt, F.; Moreira, J.C.; Pasquali, M.A.; Fries, G.R.; Quevedo, J.; Gama, C.S.; Post, R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research*, v.45, n.2, p.156-161, 2011, doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.05.015.

Karlsen, A.; Retterstol, L.; Laake, P.; Paur, I.; Bøhn, S.K.; Sandvik, L.; Blomhoff, R. Anthocyanins inhibit nuclear factor kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*, v.137, n.1, p.1951-1954, 2007.

Ketter, T.A. Diagnostic features, prevalence, and impact of bipolar disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, v.71, n.6, e14, 2010, doi: 10.4088/JCP.8125tx11c.

Kim, G.; Kim, J.; Rhie, S.; Yoom, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Experimental Neurobiology*, v.24, n.1, p.325-340, 2015, doi: 10.5607/en.2015.24.4.325.

Kim, Y.; Jung, H.; Myint, A. Kim, H.; Park, S. Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*, v.104, n.1, p.91-94, 2007, doi: 10.1016/j.jad.2007.02.018.

Kosmidou, I.; Vassilakopoulos, T.; Xagorari, A.; Zakynthinos, S.; Papapetropoulos, A.; Roussos, C. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v.26, n.5, p.587-593, 2002, doi: 10.1165/ajrcmb.26.5.4598.

Krikorian, R.; Shidler, M.; Nash, T.; Kalt, W.; Vingvist-Tymchick, M.; Skukitt-Hale, B.; Joseph, J. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agriculture and Food*, v.58, n.1, p.3996-4000, 2010, doi: 10.1021/jf9029332.

Kristiansen, L.; Meador-Woodruff, J. Abnormal striatal expression of transcripts encoding NMDA interacting PSD proteins in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Schizophrenia Research*, v.78, n.1, p. 87-93, 2005, doi: 10.1016/j.schres.2005.06.012.

Kšonžeková, P.; Mariychuk, R.; Eliašová, A.; Mudroňová, D.; Csank, T.; Klrály, J.; Marcinčáková, D.; Pistl, J.; Tkáčiková, L. In vitro study of biological activities of anthocyanin-rich berry extracts on porcine intestinal epithelial cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.96, n.4, p.1093-1100, 2016, doi: 10.1002/jsfa.7181.

Leutner, S. Eckert, A. Muller, W. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *Journal of Neural Transmission*, v.108, n.1, p.955-967, 2001, doi: 10.1007/s007020170015.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

Lyoo, I.K.; Sung, Y.H.; Dager, S.R.; Friedman, S.D.; Lee, J.Y.; Kim, N. Regional cerebral cortical thinning in bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, v.8, n.1, p.65-74, 2006, doi: 10.1111/j.1399-5618.2006.00284.x.

Machado-Viera, R.; Andreazza, A.C.; Viale, C.I.; Zanatto, V.; Cereser, V. JR; DA Silva Vargas, R.; Kapczinski, F.; Portela, L.V.; Souza, D.O.; Salvador, M.; Gentil, V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neuroscience Letters*, v.421, n.1, p.33-36, 2007, doi: 10.1016/j.neulet.2007.05.016.

Marchand, W.; Yurgelun-Todd. Striatal structure and function in mood disorders: a comprehensive review. *Bipolar Disorders*, v.12, n.1, p.765-785, 2010, doi: 10.1111/j.1399-5618.2010.00874.x.

Martinowich, K.; Schloesser, R.J.; Manji, H.K. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. *The Journal of Clinical Investigation*, v.119, n.4, p.726-736, 2009, doi: 10.1172/JCI37703.

Matés, J.; Pérez-Gomez, C.; DE Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, v.32, n.1, p.595 -603, 1999, doi: 10.1016/S0009-9120(99)00075-2.

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van, Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, v.85, n.1, p.231-237, 2004.

Misra, H. P., Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, v.247, n.1, p.3170-3175, 1972.

Modabbernia, A.; Taslimi, S.; Brietzke, E.; Ashrafi, M. Cytokines alterations in bipolar disorder: a meta analysis of 30 studies. *Biological Psychiatry*, v.74, n.1, p.15-25, 2013, doi: 10.1016/j.biopsych.2013.01.007.

Montine, T.; Neeley, D.; Quinn, J.; Beal, M.; Markesbery, W.; Roberts, L.; Morrow, J. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v.33, n.1, p.620-626, 2002, doi: 10.1016/S0891-5849(02)00807-9.

Moreau, M.P.; Bruse, S.E.; David-Rus, R.; Buyske, S.; Brzustowicz, L.M. Altered MicroRNA Expression Profiles in Postmortem Brain Samples from

Individuals with Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Biological Psychiatry*, v.69, n.1, p.188-193, 2011, doi: 10.1016/j.biopsych.2010.09.039.

Munner, A. Bipolar disorder: roll of inflammation a development of diseases biomarkers. *Psychiatry Investigation*, v.13, n.1,p.18-30, 2016, doi: 10.4306/pi.2016.13.1.18. (a)

Munner, A. The Neurobiology of Bipolar Disorder: an integrated approach. *Chonnam Medical Journal*, v. 52, n.1, p.18-37, 2016, doi: 10.4068/cmj.2016.52.1.18. (b)

Nassar, A.; Azab, A.N. Effects of lithium on inflammation. *ACS Chemical Neuroscience*, v.5, n.6, p.451-458, 2014, doi: 10.1021/cn500038f.

Ozdemircan A.; Dasdemir, S.; Kucukali, C.I.; Bireller, E.S.; Ozturk, H.; Cakmakoglu, B. COX-2 gene variants in bipolar disorder-I. *Psychiatria Danubia*, v.27, n.4, p.385-389, 2015.

Pang, W.; Jiang, Y.G.; Cheng, D.M.; Ju, H.; Lu, S.J. Cytoprotective effect of blueberry extracts against oxidative damage of rat hippocampal neurons induced by H₂O₂. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.*, v.26, n.1, p.51-54, 2010.

Papandreou, M.A.; Dlmakopoulou, A.; Linardaki, Z.I.; Cordopatis, P.; Klimis-Zacas, D.; Margarity, M.; Lamari, F.N. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioral Brain Research*, v.17, n.1, p.352-358, 2009, doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.013.

Peng, C.; Wang, X.; Chen, J.; Jiao, R.; Wang, L.; Li, Y.M.; Zuo, Y.; Liu, Y.; Lei, L.; Ma, K.Y.; Huang, Y.; Chen, Z.Y. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International*, v. 2014, n.1, p.1-13, 2014, doi: 10.1155/2014/831841.

Pisoschi, A.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.97, n.1, p.55-74, 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

Ranjekar, P.K.; Hinge, A.; Hedge, M.V.; Ghate, M.; Kale, A.; Sitasawad, S.; Wagh, U.V.; Debsikdar, V.B.; Mahadik, S.P. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorders patients. *Psychiatry Research*, v.121, n.1, p.109-122, 2003, doi: 10.1016/S0165-1781(03)00220-8.

Rawdin, B.; Mellon, S.; Dhabhar, F.; Epel, E.; Puterman, E.; Burke, H.; Reus, V.; Rosse, R.; Hamilton, S.; Nelson, J.; Wolkowitz, O. Dysregulated relationship of inflammatory and oxidative stress in major depression. *Brain, Behavior and Immunity*, v.31, n.1, p.143-152, 2013, doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.011.

Roda, Â.; Chendo, I.; Kunz, M. Biomarkers and staging of bipolar disorder: a systematic review. *Trends in Psychiatric and Psychotherapy*, v.37, n.1, p.3-11, 2015, doi: 10.1590/2237-6089-2014-0002.

Salim, S. Oxidative stress and psychological disorders. *Current Neuropharmacology*, v.12, n.1, p.140-147, 2014, doi: 10.2174/1570159X11666131120230309.

Scarr, E.; Pavey, G.; Sundram, S.; Mackinnom, A.; Dean, B. Decreased hippocampal NMDA, but not kainate or AMPA receptors in bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, v.5, n.1, p.257-264, 2003, doi: 10.1034/j.1399-5618.2003.00024.x.

Selek, S.; Altindag, A.; Saracogleu, G.; Aksoyy, N. Oxidative markers of myeloperoxidase and catalase and their diagnostic performance in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*, v.1, n.1, p.181-192, 2015, doi: 10.1016/j.jad.2015.03.058.

Singleton, V.L., Orthefer, R., Lamuela-Ranventós, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, n.1, p.152-159, 1999.

Siwek, M.; Sowa-Kucma, M.; Dudek, D.; Styczen, K.; Szewczyk, B.; Kotarska, K.; Misztak, P.; Pilc, A.; Wolak, M.; Nowak, G. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacological Reports*, v.65, n.1, p.1558-1571, 2013.

Sousa, R.; Zarate, C.; Zanetti, M.; Costa, A.; Talib, L.; Gattaz, W.; Machado-Vieira, R. Oxidative stress in early stage of bipolar disorder and the association with response to lithium. *Journal of Psychiatric Research*, v.50, n.1, p.36-41, 2014, doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.11.011.

Stark, G. Functional consequences of oxidative membrane damage. *Journal of Membrane Biology*, v.205, n.1, p.1-16, 2005, doi: 10.1007/s00232-005-0753-8.

Strakowski, S.; Adler, C.; Delbello, M. Volumetric MRI studies of mood disorders: do they distinguish unipolar and bipolar disorder? *Bipolar disorders*, v.4, n.1, p.80-88, 2002, doi: 10.1034/j.1399-5618.2002.01160.x.

Subash, S.; Essa, M.M.; AL-Adawi, S.; Memon, M.A.; Manivasagam, T.; Akbar, M. Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, v.9, n.16, p.1557-1566, 2014, doi: 10.4103/1673-5374.139483.

Vawter, M.P.; Thatcher, L.; Hyde, T.; Keinman, J.; Frees, W. Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, v.7, n.1, p.571-578, 2002, doi: 10.1038/sj.mp.4001158.

Wang, Y.; Cheng, M.; Zhang, B.; Nie, F.; Jiang, H. Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates

liver fibrosis in rats. PLOS one, v.8, n.3, p.1-8, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0058659.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. Methods in Enzymology, v.77, n.1, p.325-333, 1981.

Young, J.W.; Dulcis, D. Investigating the mechanism(s) underlying switching between states in bipolar disorder. European Journal of Pharmacology, v.759, n.1, p.151-162, 2015, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.019.

Zepeda, A.; Aguayo, L.G.; Fuentealba, J.; Figueroa, C.; Acevedo, A.; Salgado, P.; Calaf, G.M.; Farías, J. Blueberry extracts protect testis from hypobaric hypoxia induced oxidative stress in rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v.2015, n.1, p.1-7, 2012, doi: 10.1155/2012/975870.

Table 1 - Anthocyanin identification in blueberry extract.

RT (min)	[M] ⁺ (Molecular formula, ppm)	Fragment ion [M – X] ⁺ (Molecular formula, ppm)	Tentative identification
1.84	449,1074 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ , -2,20)	287,0552 [M - hexosyl group] ⁺ (C ₁₅ H ₁₁ O ₆ , -1.0)	Cianidin-3-O-hexoside
1.86	449,1075 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ , -2,00)	287,0552 [M - hexosyl group] ⁺ (C ₁₅ H ₁₁ O ₆ , -1.0)	Cianidin-3-O-hexoside
2.03	419,0969 (C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀ , -2,10)	287,0552 [M - pentosyl group] ⁺ (C ₁₅ H ₁₁ O ₆ , -1.0)	Cianidin-3-O-pentoside
2.13	463,1230 (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ , -2,20)	301,0711 [M - hexosyl group] ⁺ (C ₁₆ H ₁₃ O ₆ , -1.3)	Peonidin-3-O-hexoside
2.40	463,1231 (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ , -1,90)	301,0711 [M - hexosyl group] ⁺ (C ₁₆ H ₁₃ O ₆ , -1.3)	Peonidin-3-O-hexoside
1.62	465,1028 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂ , -1,10)	303,0505 [M - hexosyl group] ⁺ (C ₁₅ H ₁₁ O ₇ , 0.0)	Delphinidin-3-O-hexoside
1.83	435,0922 (C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁ , -1,10)	303,0505 [M - pentosyl group] ⁺ (C ₁₅ H ₁₁ O ₇ , 0.0)	Delphinidin-3-O-pentoside
1.96	479,1180 (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂ , -2,10)	317,0668 [M - hexosyl group] ⁺ (C ₁₆ H ₁₃ O ₇ , 0.3)	Petunidin-3-O-hexoside
2.18	493,1338 (C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂ , -1,60)	331,0814 [M - hexosyl group] ⁺ (C ₁₇ H ₁₅ O ₇ , -1.5)	Malvidin-3-O-hexoside

Legends of Figures

Figure 1- Treatment protocol.

Figure 2 - Effect of blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) and lithium chloride pretreatment (45 mg/kg, p.o.) on ketamine-induced hyperactivity in the open-field test in rats. Data were expressed as mean(s) $\pm$ S.E.M. (**) Denotes $P < 0.01$ as compared to the vehicle/saline group. (#) Denotes $P < 0.05$ as compared to the vehicle/ketamine group (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $n=8-10$]

Figure 3 – Effects of blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) and lithium chloride pretreatment (45 mg/kg, p.o.) on levels of TBARS (A); total thiol content (B); superoxide dismutase activity (C); catalase activity (D); and glutathione peroxidase activity (E) in cerebral cortex of animals submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data were expressed as mean $\pm$ SEM. * Denotes $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared to the vehicle/saline group. # Denotes $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ as compared to vehicle/ketamine group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $n=5-6$).

Figure 4- Effects of blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) and lithium chloride pretreatment (45 mg/kg, p.o.) on levels of TBARS (A); total thiol content (B); superoxide dismutase activity (C); catalase activity (D); and glutathione peroxidase activity (E) in hippocampus of animals submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. **Denotes $P < 0.01$ as compared to the vehicle/saline group. # Denotes $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ as compared to vehicle/ketamine group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $n=5-6$).

Figure 5 - Effects of blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) and lithium chloride (45 mg/kg, p.o.) pretreatment on levels of TBARS (A); total thiol content (B); superoxide dismutase activity (C); catalase activity (D); and glutathione peroxidase activity (E) in striatum of animals submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. * Denotes $P < 0.05$ as compared to the vehicle/saline group. *Denotes $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ as compared to vehicle/ketamine group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $n=5-6$).

0.01 as compared to vehicle/ketamine group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, n=5-6).

Figure 6 - Effects of blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) and lithium chloride (45 mg/kg, p.o.) pretreatment in serum levels of IL-6 and IL-10 levels in animals submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. ** Denotes $P < 0.01$ as compared to the vehicle/saline group. # Denotes $P < 0.01$ as compared to the vehicle/ketamine group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, n=5-6).

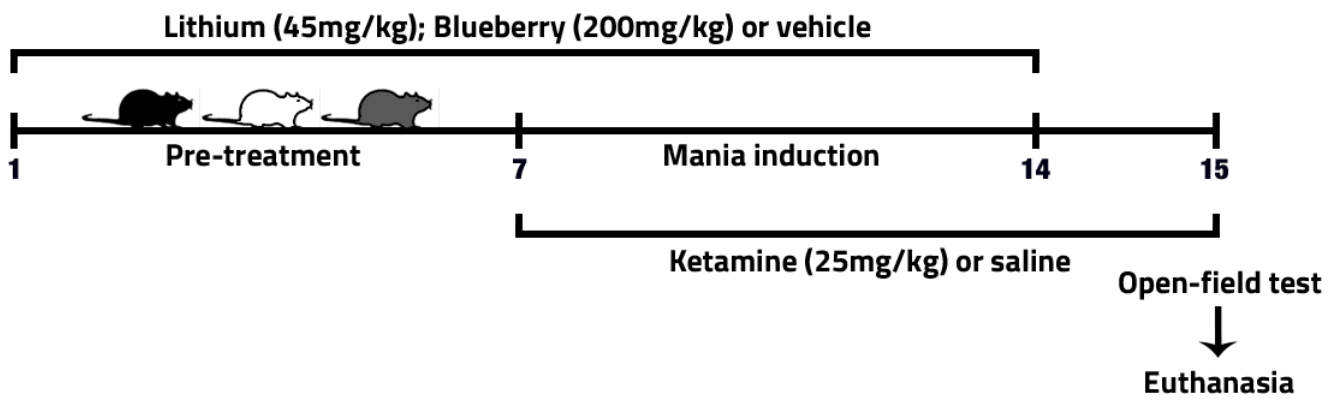


Figure 1

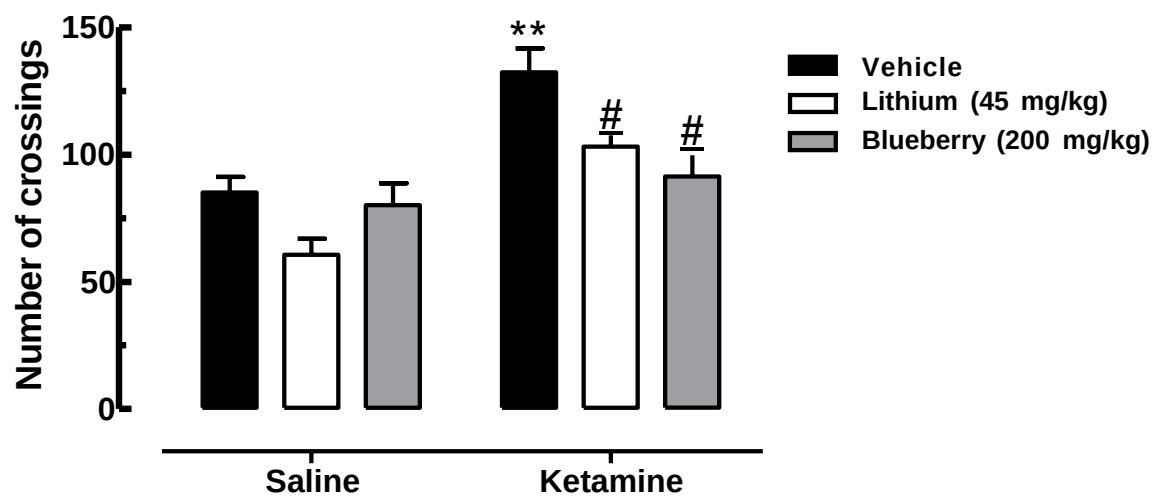


Figure 2

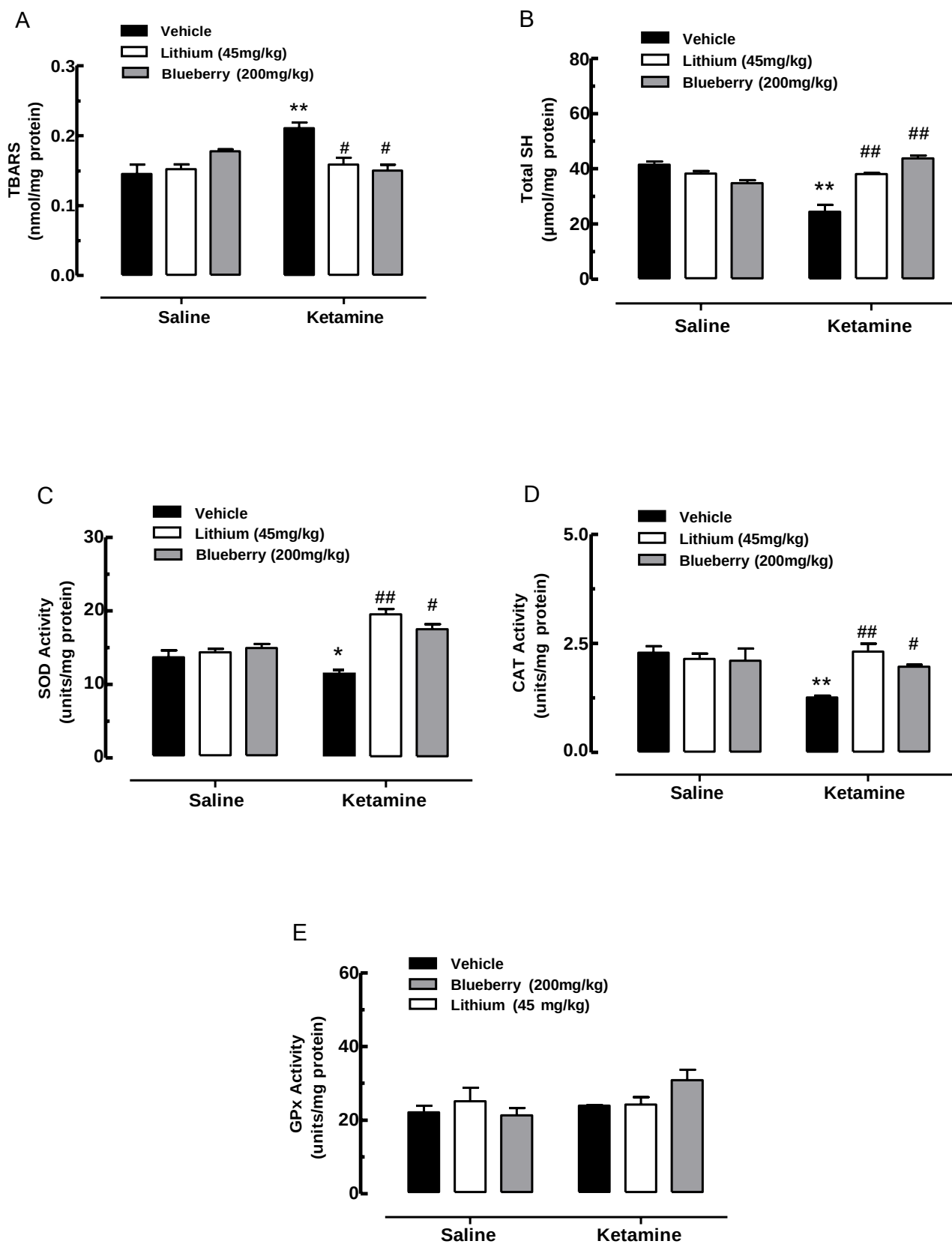


Figure 3

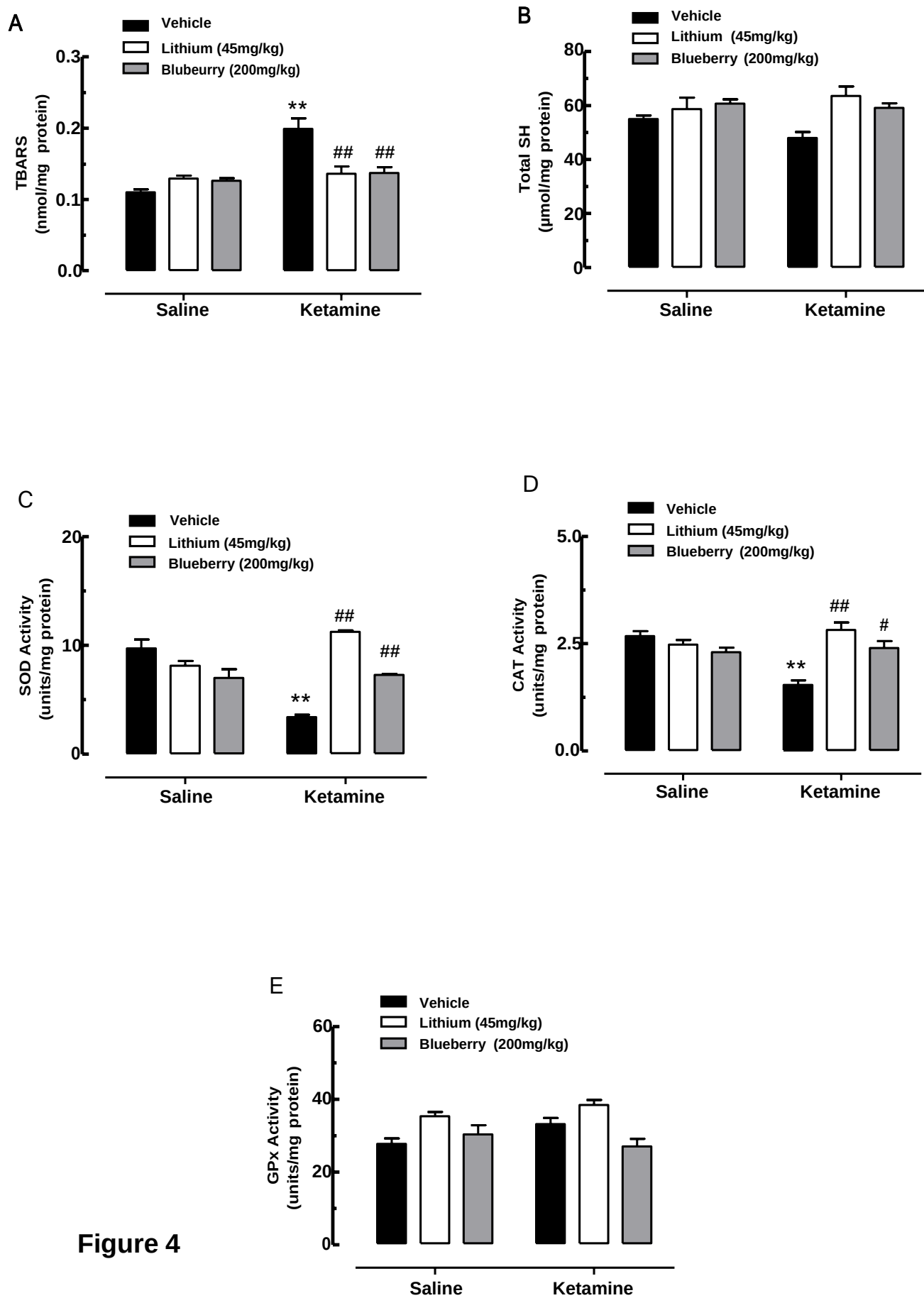
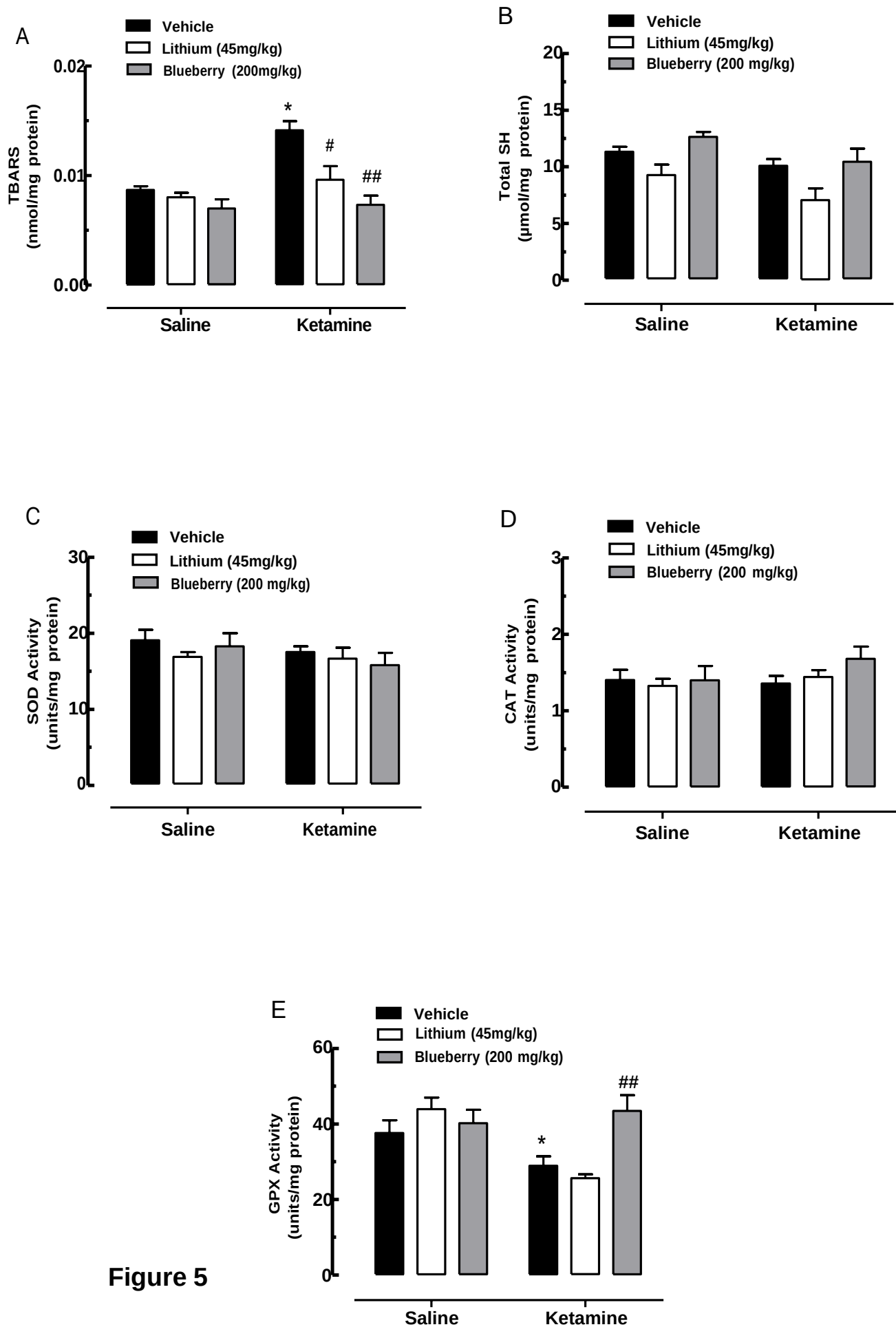


Figure 4



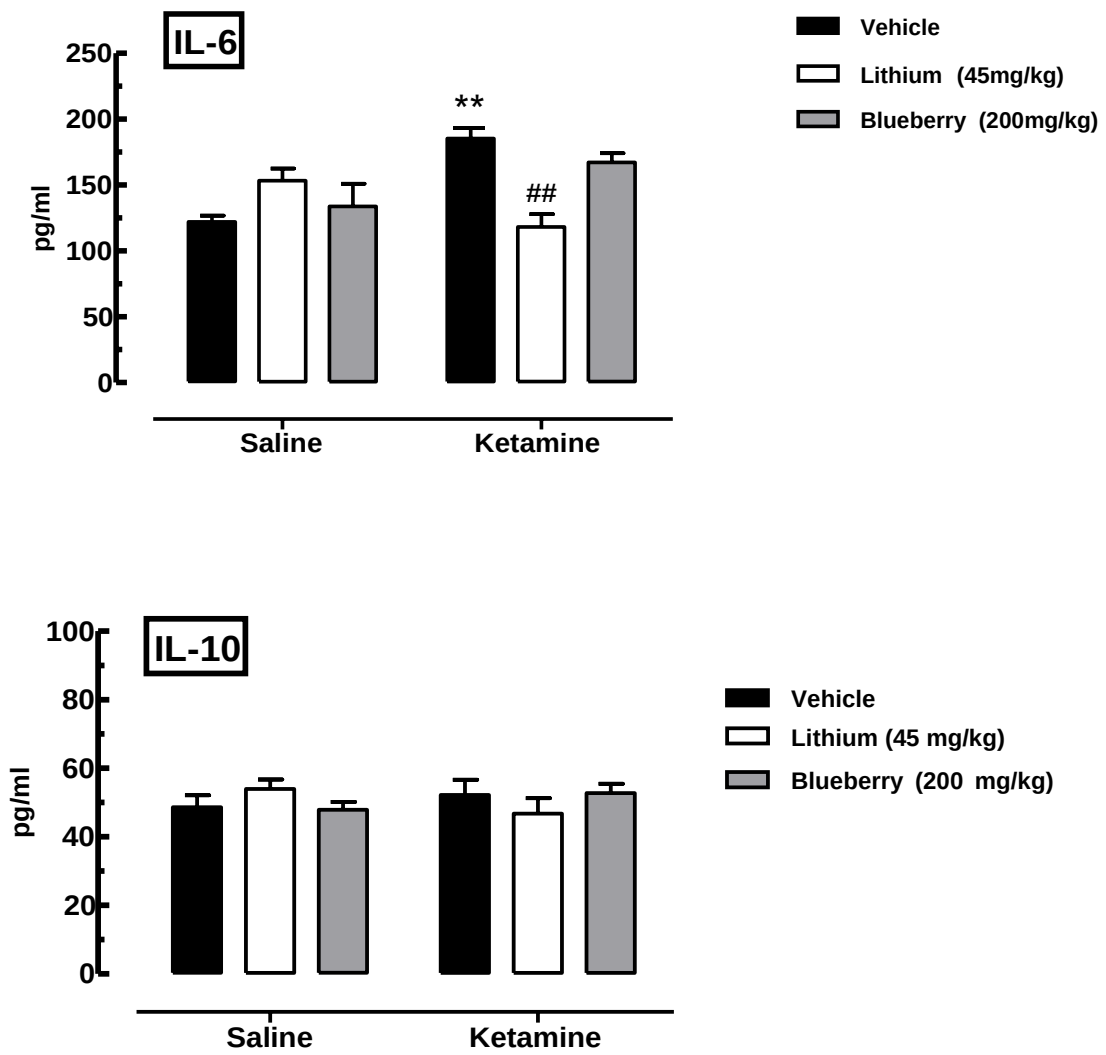


Figure 6

5. Conclusões

A cetamina vem sendo usada para induzir episódios maníacos em ratos, os quais são evidenciados por um aumento na hiperlocomção através do teste de campo aberto. No presente estudo a cetamina na dose de 25 mg/kg induziu hiperlocomção nos animais e o tratamento com extrato de mirtilo foi capaz de prevenir esta alteração. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos com carbonato de lítio, o fármaco de escolha usado no tratamento dos transtornos de humor bipolar. Desta forma, sugere-se que o mirtilo pode contribuir na prevenção da recorrência de novos episódios maníacos.

O episódio maníaco induzido pela cetamina causou alterações em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos demonstrando que alterações no estado redox podem contribuir para as disfunções neuroquímicas relacionadas com a progressão dos transtornos de humor. O extrato de mirtilo foi capaz de prevenir o estresse oxidativo causado pela mania sendo que esse efeito pode estar associado aos compostos naturais encontrados na fruta, principalmente as antocianinas. As antocianinas são flavonoides que apresentam em sua estrutura grupamentos químicos que podem atuar como potentes agentes antioxidantes.

Um aumento nos níveis de IL-6 foi observado em ratos submetidos a um modelo experimental de mania. Elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-6 está associada a episódios maníacos e depressivos. É importante destacar que neste trabalho somente o tratamento com lítio foi capaz de diminuir os níveis de IL-6 no soro de ratos tratados com cetamina.

O ambiente pró-inflamatório, associado ao caráter pró-oxidante, poderia estar envolvido com a fisiopatologia de THB, ou a piora do quadro clínico do paciente, através do aumento da recorrência dos episódios agudos. A descoberta de alternativas que possam prevenir o TB é de grande importância, visto que este apresenta um impacto desfavorável na população mundial. Neste estudo foi demonstrado que a administração do extrato de mirtilo

preveniu a hiperlocomoção bem como o estresse oxidativo induzido por cetamina em ratos. Estes resultados sugerem um potencial do extrato de mirtilo na prevenção da recorrência de novos episódios maníacos bem como em modular mecanismos que podem estar associados com a neurodegeneração associada aos transtornos de humor, porém mais estudos são necessários para comprovar este efeito benéfico e por fim considerar o mirtilo como um potencial alvo terapêutico.

6. Referências Bibliográfica

ABBAS, A. K. e LITCHMAN, A.H. **Imunologia Básica - Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. Brasil: Elsevier, 2007. 354 pg.

ALTAMURA, A.C.; BUOLI, M.; POZZOLI, S. **Role of immunological factors on the pathophysiology and diagnosis of bipolar disorder: Comparision with schizophrenia**. Psychiatric and Clinical Neuroscience, v.68, n.1, p. 21-36, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifht Edition (DMS-V)** Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.

AYDEMIR, O.; ÇUBUKÇUOĞLU, Z.; ERDIN, S.; TAS, C.; ONUR, E.; BERK, M. **Oxidative stress markers, cognitive functions, and psyshosocial functioning in bipolar disorder: an empirical cross-sectional study**. Revista Brasileira de Psiquiatria, Rio de Janeiro, v.36, n.1, p. 293-297, 2014.

BAGCHI, D.; SEN, C.K.; BAGCHI, M.; ATALAY, M. **Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula**. Biochemistry (Moscow), v.9, n.1, p.75-80, 2004.

BARBOSA, I.G.; ROCHA, N.P.; ASSIS, F.; VIEIRA, E.L.M.; SOARES, J.C.; BAUER, E.; TEIXEIRA, A.L. **Monocyte and Lymphocyte activation in bipolar disorder: A new piece in the puzzle of immune dysfunction in mood disorders**. International Journal of Neuropsychopharmacology, v.18, n.1, p. 1-7, 2014.

BARNETT, J.H.; SMOLLER, J.W. **The genetics of bipolar disorder**. Neuroscience, v.164, n.1, p.331-343, 2009.

BAUER, I.E.; PASCOE, M.C.; WOLLENHAUOT-AGUIAR, B.; KAPCZINSKI, F.; SOARES, J.C. **Inflammatory mediators of cognitive impairment in bipolar disorder**. Journal of Psychiatric Research, v.56, n.1; p. 18-27, 2014.

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A.C.; DEAN, O.M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YUCEL, M.; GAMA, C.S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHÃES, P.V.S.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G.S. **Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors**. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, Reino Unido, v.35, n.1, p.804-817, 2011.

BREWER, G.J.; TORICELLI, J.R.; LINDSEY, A.L.; KUNZ, E.Z.; NEUMAN, A.; FISHER, D.R.; JOSEPH, J.A. **Age-related toxicity of amyloid-beta associated with increased pERK and pCREB in primary hippocampal neurons: reversal by blueberry extract.** Journal of Nutricional Biochemistry, v.21, n.1, p.991-998, 2010.

BRUNING, C.A.; PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; PINTON, S.; NOGUEIRA, C.W. **Diphenyl diselenide ameliorates bahavioral and oxidative parameters in an animal model of mania induced by ouabain.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, v.38, n.1, p.168-174, 2012.

BUDNI, J.; VALVASSORI, S.S.; QUEVEDO, J. **Biological mechanisms underlying neuroprogression in bipolar disorder.** Revista Brasileira de Psiquiatria, Rio de Janeiro, v.35, n.1, p.1-2, 2013.

CARVALHO, F.B.; GUTIERRES, J.M.; BOHNERT, C.; ZAGO, A.M.; ABDALLA, F.H.; VIEIRA, J.M.; PALMA, H.E.; OLIVEIRA, S.M.; SPANEVELLO, R.M.; DUARTE, M.M.; LOPES, S.T.A.; AIELLO, G.; AMARAL, M.G.; PIPPI, N.L.; ANDRADE, C.M. **Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination.** Journal of Nutritional Biochemistry, v.26, n.1, p.378-390, 2015.

CASTRO-COSTA, E.; SILVA, A.G. **A adesão terapêutica no transtorno bipolar.** Revista Debates em Psiquiatria, Rio de Janeiro, v.5, n.1, p.8-10, 2011.

ÇOBAN, J.; EVRAN, B.; OZKAN, F.; ÇEVİK, A.; DOORU-ABBASOOLU, S.; UYSAL, M. **Effect of blueberry feeding on lipids and oxidative stress in the serum, liver and aorta of guinea pigs on a high-cholesterol diet.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.77, n.2, p.389-391, 2013.

CZERSKA, M.; MIKOLAJEWSKA, K.; ZIELINSKA, M.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. **Today's oxidative stress markers.** Medycyna Pracy, v.66, n.3, p.393-405, 2015.

DELL-AGIO JR, J.C.; BASSO, L.A.; ARGIMON, I.I.L.; ARTECHE, A. **Systematic review of the prevalence of bipolar disorder and bipolar spectrum disorders in population-based studies.** Trends in Psychiatry and Psychotherapy, v.35, n.2, p.99-105, 2013.

DIACONESA, Z.; LEOPOLD, L.; RUGINA, D.; AYVAZ, H.; SOCAIU, C. **Antiproliferative and antioxidante properties of anthocyanins rich extracts from blueberry and blackcurrant juice.** International Journal of Molecular Science, v.16, n.1, p.2352-2365, 2015.

DINIZ, B.S.; MACHADO-VIEIRA, R.; FORLENZA, O.V. **Lithium and neuroprotection: translational evidence and implications for the treatment of neuropsychiatric disorders.** Neuropsychiatric Disease and Treatment, v.9, n.1, p.493-500, 2013.

ENKHUIZEN, J.V.; JANOWSKY, D.S.; OLIVIER, B.; MINASSIAN, A.; PERRY, W.; YOUNG, J.W.; GEYER, M.A. **The catecholaminergic-cholinergic balance hypothesis of bipolar disorder revisited.** European Journal of Pharmacology, v.753, n.1, p.114-126, 2015.

ERLUND, I.; KOLI, R.; ALFTHAN, G.; MARNIEMI, J.; PUUKKA, P.; MUSTONEN, P.; MATTILA, P.; JULA, A. **Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol.** The American Journal of Clinical Nutrition, v.87, p.323-331, 2008.

FACHINELLO, J.C. **Mirtilo.** Revista Brasileira de Fruticultura, v.30, n.2, p.285-576, 2008.

FREY, B.N.; VAVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; MARTINS, M.R.; PETRONILHO, F.C.; BARDINI, K.; DAL-PIZZOL, F.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. **Effects of lithium and valproate on amphetamine induced oxidative stress generation in an animal model of mania.** Journal of Psychiatric Neuroscience, v. 31, n.1, p.326-332, 2006.

GAZAL, M.; VALENTE, M.R.; ACOSTA, B.A.; KAUFMANN, F.N.; BRAGANHOL, E.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M.; GHISLENI, G.; KASTER, M.P. **Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats.** European Journal of Pharmacology, v.724, n.1, p.132-139, 2014.

GHANIZADEH, A.; BERK, M. **Molecular hydrogen: an overview of its neurobiological effects and therapeutical potential for bipolar disorder and schizophrenia.** Medical Gas Research, v.11, n.3, p. 1-6, 2013.

GHEDIM, F.V.; FRAGA, D.B.; DEROZA, P.F.; OLIVEIRA, M.B.; VALVASSORI, S.S.; STECKERT, A.V.; BUDNI, J.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; ZUGNO, A.I. **Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: Implications as an animal model of mania.** Journal of Psychiatric Research, v.46, n.1, p.1569-1575, 2012.

GOODWIN, F.K.; JAMISON, K.R. **Manic-depressive illness.** Oxford, Oxford University Press, 2007.

GUTIERRES, J.M.; CARVALHO, F.B.; SCHETINGER, M.R.C.; MARISCO, P.; AGOSTINHO, P.; RODRIGUES, M.; RUBIN, M.A.; SCHMATZ, R.; SILVA, C.R.; COGNATO, G.P.; FARIAS, J.G.; SIGNOR, C.; MORSCH, V.M.; MAZZANTI, C.M.; BOGO, M.; BONAN, C.D.; SPANEVELLO, R. **Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by atreptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type.** Life Sciences, v.96, n.1, p.7-17, 2014.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine.** New York: Oxford University Press, 2007.

HAYDEN, E.P.; NURNBERGER JR. **Molecular genetics of bipolar disorder.** Genes, Brain and Behavior, v.5, n.1, p.85-95, 2006.

JESUS, T.F.P. **O mirtilo e suas propriedades terapêuticas.** 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; CASADESUS, G. **Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds.** The American Journal of Clinical Nutrition, v.81, n.1, p.313-316, 2005.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; WILLIS, L.M. **Grape juice, berries and walnuts affect brain aging and behavioral.** The Journal of Nutritional, v.1, n.1, p.1813-1817, 2009.

JOSHI, Y.B.; PRATICÒ, D. **Lipid Peroxidation in psychiatric illness: overview of clinical evidence.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v.2014, n.1, p.1-5, 2014.

KAPCZINSKI, F.; DAL-PIZZOL, F.; TEIXEIRA, A.L.; MAGALHÃES, P.V.S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; KLAMT, F.; MOREIRA, J.C.F.; PASQUALI, M.A.B.; FRIES, G.R.; QUEVEDO, J.; GAMA, C.S.; POST, R. **Pheripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder.** Journal of Psychiatric Research, v.45, n.1, p. 156-161, 2011.

KRIKORIAN, R.; SHIDLER, M.; NASH, T.; KALT, W.; VINGVIST-TYMCHUCK, M.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. **Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults.** Journal of Agriculture and Food, v.58, n.1, p.3996-4000, 2010.

KUNZ, M.; CERESÉR, K.M.; GOI, P.D.; FRIES, G.R.; TEIXEIRA, A.L.; FERNANDES, B.S.; BELMONTE-DE-ABREU, P.S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; KAPCZINSKI, F.; GAMA, C.S. **Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance.** Revista Brasileira de Psiquiatria, v.33, n.3, p.268-274, 2011.

LAFER, B.; NERY, F.G. **Tratamento da Depressão Unipolar.** Revista Debates em Psiquiatria, v.5, n.1, p.14-20, 2011.

LUSHCHAKV.I. **Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.** Chemico-Biological Interactions, v.224, n.1, p.164-175, 2014.

MACHADO-VIEIRA, R.; BRESSAN, R.A.; FREY, B.; SOARES, J.C. **As bases neurobiológicas do transtorno bipolar.** Revista de Psiquiatria Clínica, v.32, n.1, p.28-33, 2005.

MAGALHÃES, P.V.S; FRIES, G.R.; KAPCZINSKI, F. **Marcadores periféricos e a fisiopatologia do transtorno bipolar**. Revista de Psiquiatria Clínica, v.39, n.2, p.60-67, 2012.

MANGANARIS, G.A.; GOULAS, V.; VICENTE, A.T.; TERRY, L.A. **Berry antioxidants: small fruits providing large benefits**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.94, n.5, p.825-833, 2014.

MARY, H. G.; DAVID, M. R.; PETER, K.; ALEXANDER, P.; SITHES, L.; GAD, G., et al. **Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* aiton**. Phytomedicine, v. 16, p. 406-415, 2009.

MAY, J.; HICKEY, M.; TRIANTIS, J.; PALAZIDOU, E.; KRYRIACOU, P.A. **Spectrophotometric analysis of lithium carbonate used for bipolar disorder**. Biomedical Optics Express, v.6, n.3, p.1067-1073, 2015.

MICHELON, L.; VALLADA, H. **Genética do transtorno bipolar**. Revista Brasileira de Psiquiatria, v.16, n.3, p.12-16, 2004.

MORETTI, M.; VALVASSORI, S.S.; STECKERT, A.V.; ROCHI, N.; BENEDET, J.; SCAINI, G.; KAPCZINSKI, F.; STRECK, E.L.; ZUGNO, A.I.; QUEVEDO, J. **Tamoxifen effects on respiratory chain complexes and creatine kinase activities in an animal model of mania**. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v.98, n.1, p.304-310, 2011.

MUNEER, A. **Bipolar disorder: Role of inflammation and the development of disease biomarkers**. Psychiatric Investigation, v.13, n.1, p.18-33, 2016.

MUNEER, A. **The neurobiology of bipolar disorder: an integrated approach**. Chonnam Medical Journal, v.52, v.1, p.18-37, 2016.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunologia de Janeway**. Brasil: Artmed, 2010. 908 pg.

NASSAR, A.; AZAB, A.N. **Effects of lithium on inflammation**. ACS Chemical Neuroscience, v.5, n.1, p. 451-458, 2014.

NAVABI, S.M.; DAGLIA, M.; BRAIDY, N.; NAVABI, S.F. **Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review**. Nutricional Neuroscience, v.2015, n.1, p.1-15, 2015.

NOLEN, W.A. **More robust evidence for the efficacy of lithium in the long-term treatment of bipolar disorder: should lithium (again) be recommended as the single preferred first-line treatment?** International Journal of Bipolar Disorder, v.3, n.1, p.1-3, 2015.

ORUCH, R.; ELDERBI, M.; KHATTAB, H.A.; PRYME, I.F.; LUND, A. **Lithium: a review of pharmacology, clinical uses, and toxicity**. European Journal of Pharmacology, v.740, n.1, p.464-473, 2014.

OZDEMIRCAN A.; DASDEMIR, S.; KUCUKALI, C.I.; BIRELLER, E.S.; OZTURK, H.; CAKMAKOGLU, B. **COX-2 gene variants in bipolar disorder-1**. Psychiatric Danubina, v.27, n.4, p.385-389, 2015.

PENG, C.; WANG, X.; CHEN, J.; JIAO, R.; WANG, L.; LI, Y.M.; ZUO, Y.; LIU, Y.; LEI, L.; MA, K.Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. **Biology of ageing and role of dietary antioxidants**. BioMed Research International, v. 2014, n.1, p.1-13, 2014.

PERTUZATTI, P.B.; BARCIA, M.T.; RODRIGUES, D.; CRUZ, P.N.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; SMITH, R.; GODOY, H.T. **Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries**. Food Chemistry, v.164, n.1, p.81-88, 2014.

PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREMER, G.; MAINLAND, C.M. **Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanins content, maturity, and variety of *Vaccinium* species**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.46, n.1, p.2686-2693, 1998.

RAMIREZ, M.R.; GUTERRES, L.; DICKEL, O.E.; CASTRO, M.R.; HENRIQUES, A.T.; SOUZA, M.M.; BARROS, D.M. **Preliminary studies on the antinociceptive activity of *Vaccinium ashei* Berry in experimental animal models**. Journal of Medical Food, v.13, n.2, p.336-342, 2010.

RODA, A.; CHENDO, I.; KUNZ, M. **Biomarkers and staging of bipolar disorder: a systematic review**. Trends in Psychiatry and Psychotherapy, v.37, n.1, p. 3-8, 2015.

RODRIGUES, E.; POERNER, N.; ROCKENBACH, I.I.; GONZAGA, L.V.; MENDES, C.R.; FETT, R. **Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.31, n.4, p.911-917, 2011.

SALIM, S. **Oxidative stress and psychological disorders**. Current Neuropharmacology, v.12, n.1, p.140-147, 2014.

SHINE, B.; MCKNIGHT, R.F.; LEAVER, L.; GEDDES, J.R. **Long-term effects of lithium on renal, thyroid, and parathyroid functions: a retrospective analysis of laboratory data**. Lancet, v.386, n.1, p.461-468, 2015.

SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R.L.; METERKO, V.; CAREY, A.; BIELINSKI, D.F.; MCGHIE, T.; JOSEPH, J.A. **Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress**. Age, v.27, n.1, p.49-57, 2005.

SILVA, F.C.C.; DANTAS, R.T.; CITÓ, M.C.O.; SILVA, M.I.G.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. **Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão**. Revista Neurociências, v.18, n.2, p.227-237, 2010.

SIWEK, M.; SOWA-KUCMA, M.; DUDEK, D.; STYCZEN, K.; SZEWCZYK, B.; KOTARSKA, K.; MISZTAK, P.; PILC, A.; WOLAK, M.; NOWAK, G. **Oxidative stress markers in affective disorders**. Pharmacological Reports, v.65, n.1, p.1558-1571, 2013.

SKRONVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. **Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of Berries**. International Journal of Molecular Science, v. 16, n.1, p.24673-24706, 2015.

SLATERRY, D.A.; CRYAN, J.F. **The ups and downs of modelling mood disorders in rodents**. ILAR Journal, v.55, n.2, p.297-309, 2014.

SOUSA, R.T.; ZARATE JR., C.A.; ZANETTI, M.V.; COSTA, A.C.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F.; MACHADO-VIEIRA, R. **Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium**. Journal of Psychiatric Research, v.50, n.1, p.36-41, 2014.

SUBASH, S.; ESSA, M.M.; AL-ADAWI, S.; MEMON, M.A.; MANIVASAGAM, T.; AKBAR, M. **Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases**. Neural Regeneration Research, v.9, n.16, p.1557-1566, 2014.

SZMULEWICZ, A.G.; SAMAMÉ, C.; MARINO, D.J.; STREJILEVICH, S.A. **Na updated review on the neuropsychological profile of subjects with bipolar disorder**. Archives of Clinical Psychiatry, v.42, n.5, p.139-146, 2015.

TONIN, P.T.; VALVASSORI, S.S.; LOPES-BORGES, J.; MARIOT, E.; VARELA, R.B.; TEIXEIRA, A.L.; QUEVEDO, J. **Effects of ouanain on cytokine/chemokine levels in an animal model of mania**. Journal of Neuroimmunology, v.276, n.1, p.236-239, 2014.

TORRI, E.; LEMOS, M.; CALIARI, V.; KASSUYA, C.A.L.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. **Anti-inflammatory and antinociceptive properties of blueberry extract (*Vaccinium corymbosum*)**. Journal of Pharmacology, v.59, n.1, p.591-596, 2007.

VALVASSORI, S.S.; BUDNI, J.; VARELA, R.B.; QUEVEDO, J. **Contributions of animal models to the study of mood disorders**. Revista Brasileira de Psiquiatria, v.35, n.1, p.121-131, 2013.

WANG, Y.; CHENG, M.; ZHANG, B.; NIE, F.; JIANG, H. **Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats**. PLOS one, v.8, n.3, p.1-8, 2013.

YOUNG, J.W.; DULCIS, D. **Investigating the mechanism(s) underlying switching between states in bipolar disorder**. European Journal of Pharmacology, v.759, n.1, p.151-162, 2015.

ZEPEDA, A.; AGUAYO, L.G.; FUENTEALBA, J.; FIGUEROA, C.; ACEVEDO, A.; SALGADO, P.; CALAF, G.M.; FARÍAS, J. **Blueberry extracts protect testis from hypobaric hypoxia induced oxidative stress in rats**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v.2015, n.1, p.1-7, 2012.

ANEXO

**ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Pelotas, 12 de dezembro de 2013

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)

Para: Professora Elizandra Braganhol

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

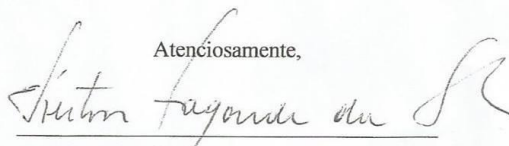
A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Efeitos da leptina e de antocianinas em parâmetros comportamentais, bioquímicos e de estresse oxidativo em animais submetidos ao modelo experimental de mania”**, processo nº23110.009026/2013-02, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9026).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 19 / 12 / 2013

Assinatura da Professora Responsável:

