

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Efeito do extrato de frutos de mirtilo e/ou do lítio sobre o status redox e na
atividade das enzimas acetilcolinesterase e Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos
submetidos a um modelo experimental de mania**

Luiza Spohr

Pelotas, 2018

Luiza Spohr

Efeito do extrato de frutos de mirtilo e/ou do lítio sobre o status redox e na atividade das enzimas acetilcolinesterase e Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de mania

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 Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S762e Spohr, Luiza

Efeito do extrato de frutos de mirtilo e/ou do lítio sobre o status redox e na atividade das enzimas acetilcolinesterase e Na^+ , K^+ -ATPase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de mania / Luiza Spohr ; Roselia Maria Spanevello, orientadora. — Pelotas, 2018.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Transtorno de humor bipolar. 2. Hiperlocomoção. 3. Mirtilo. 4. Estresse oxidativo. 5. Acetilcolinesterase, na^+ , k^+ -atpase. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Luiza Spohr

Efeito do extrato de frutos de mirtilo e/ou do lítio sobre o status redox e na atividade das enzimas acetilcolinesterase e Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de mania

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (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: 28 de março de 2018

Banca examinadora:



Profª. Drª. Roselia Maria Spanevello (Orientadora).
Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).



Prof. Dr. Claiton Leoneti Lencina
Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Université de Picardie Jules Verne (UPJV).



Prof. Dr. César Augusto Brüning
Doutor em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Dedico

Dedico este trabalho aos meus pais Gilmar e
Rosani por não medirem esforços para que eu
chegasse até aqui e aos meus irmãos pelo amor
incondicional.

Ao meu namorado Cristian por nunca deixar
de ser o meu melhor amigo.

Esse é o resultado dos nossos esforços.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por ter me concedido coragem e determinação para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Gilmar e Rosani, por todo o amor, confiança e apoio. Vocês têm todo o meu amor e gratidão. Aos meus irmãos Carlos Vinícius, Gabriel e Laura, obrigada por estarem ao meu lado e por sempre torcerem por mim. Vocês são a minha saudade diária, essa conquista é para vocês!

Ao meu namorado Cristian pelo carinho, afeto e compreensão. Obrigada por estar comigo em todos os momentos, agradeço todos os dias por tê-lo em minha vida.

As minhas cunhadas Carine e Nessana, vocês ocupam um lugar especial em meu coração.

A minha madrinha Cleria pelo incentivo, confiança e carinho. Por ti tenho muita admiração e gratidão.

A minha orientadora Roselia, por ter me recebido de braços abertos desde o primeiro contato e pela sabedoria com que conduziu esse trabalho. Agradeço pela confiança e por acreditar que eu seria capaz, por sempre me mostrar que tudo dá certo no final. Obrigada por ser sempre tão atenciosa, és um exemplo de profissional e de ser humano. Muito obrigada por tudo, tu és uma pessoa maravilhosa!

A professora Francieli Stefanello por estar sempre disponível para ajudar. Por ti tenho muito carinho e admiração.

A professora Lauren Zamin por despertar em mim o gosto pela bioquímica e pela pesquisa, obrigada pela atenção de sempre.

A minha colega e amiga Mayara, esse espaço é pequeno demais para deixar todo o meu agradecimento. Contigo aprendi e aprendo muito. Obrigada por tudo!

Aos amigos e colegas de laboratório pelo apoio na realização deste trabalho, pelo companheirismo e por alegrarem os meus dias.

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela oportunidade e a todo corpo docente por todo aprendizado.

Aos professores César e Claiton por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independente das circunstâncias devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

(Dalai Lama)

Resumo

SPOHR, Luiza. **Efeito do extrato de frutos de mirtilo e/ou do lítio sobre o status redox e na atividade das enzimas acetilcolinesterase e Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de mania.** 2018. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O transtorno de humor bipolar é um distúrbio psiquiátrico grave caracterizado por episódios recorrentes de mania e depressão. Considerando que essa patologia tem um impacto negativo à vida dos portadores, se torna crucial a busca por agentes neuroprotetores. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos protetores do extrato de frutos de mirtilo e/ou do lítio sobre parâmetros de estresse oxidativo, bem como na atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos submetidos ao modelo experimental de mania induzido por cetamina. Ratos *Wistar* machos foram pré-tratados com veículo, extrato de mirtilo (200 mg/kg) e/ou lítio (45 mg/kg ou 22,5 mg/kg duas vezes ao dia) durante 14 dias. Entre os dias 8 e 14, os animais também receberam por via intraperitoneal uma injeção de cetamina (25 mg/kg) ou veículo. No 15º dia os animais receberam uma única injeção de cetamina e após 30 minutos a atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto. A administração de cetamina induziu um aumento na atividade locomotora dos animais, bem como alterações em parâmetros de estresse oxidativo, como aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitrito, além da diminuição na atividade de enzimas antioxidantes. O pré-tratamento com extrato de mirtilo ou lítio foi capaz de prevenir a hiperlocomoção, bem como os parâmetros de estresse oxidativo induzidos pela cetamina em córtex cerebral, hipocampo e estriado. Quando o extrato de mirtilo foi associado ao lítio, as alterações foram parcialmente prevenidas. A cetamina aumentou a atividade das enzimas AChE e Na^+, K^+ -ATPase, enquanto o extrato de mirtilo preveniu parcialmente essas alterações. Nosso estudo demonstrou que o extrato de mirtilo possui capacidade neuroprotetora frente ao modelo experimental de mania, entretanto devem ser realizados mais estudos para avaliar seus efeitos como adjuvante.

Palavras-chave: transtorno de humor bipolar; hiperlocomoção; mirtilo; estresse oxidativo; acetilcolinesterase; Na^+, K^+ -ATPase.

Abstract

SPOHR, Luiza. **Effect of the extract of blueberry fruits and/or lithium on the redox status and the activity of the enzymes acetylcholinesterase and Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain submitted to an experimental model of mania**. 2018. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Bipolar disorder is a severe psychiatric disease characterized by recurrent episodes of mania and depression. Considering that this pathology has a negative impact on the life of the patients, the search for neuroprotective agents becomes crucial. The objective of this study was to investigate the protective effects of blueberry fruit extract and/or lithium on oxidative stress parameters, as well as on the activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain submitted to the experimental model of mania induced by ketamine. Male Wistar rats were pretreated with vehicle, blueberry extract (200 mg/kg) and/or lithium (45 mg/kg or 22.5 mg/kg twice daily) for 14 days. Between days 8 and 14, the animals also received an intraperitoneal injection of ketamine (25 mg/kg) or vehicle. On the 15th day the animals received a single injection of ketamine and after 30 minutes the locomotor activity was evaluated through the open field test. The administration of ketamine induced an increase in the locomotor activity of the animals, as well as alterations in oxidative stress parameters, such as increase in the levels of reactive oxygen species (ROS), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and nitrite, besides the decrease in activity of antioxidant enzymes. Pretreatment with blueberry or lithium extract was able to prevent hyperlocomotion as well as the parameters of oxidative stress induced by ketamine in cerebral cortex, hippocampus and striatum. When the blueberry extract was associated with lithium, the alterations were partially prevented. Ketamine increased the activity of the enzymes AChE and Na⁺,K⁺-ATPase, while the blueberry extract partially prevented these alterations. Our study demonstrated that the extract of blueberry has neuroprotective capacity against the experimental model of mania, however, more studies should be done to evaluate its effects as an adjuvant.

Keywords: bipolar disorder; hyperlocomotion; blueberry; oxidative stress; acetylcholinesterase; Na⁺,K⁺-ATPase.

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismo enzimático antioxidante.....	21
Figura 2	Mecanismo de ação da enzima Na^+, K^+ -ATPase.....	23
Figura 3	Neurotransmissão colinérgica.....	24
Figura 4	Estrutura geral das antocianinas.....	27

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAT	Catalase
ChAT	Colina acetiltransferase
ChT	Transportador de colina de alta afinidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione S-transferase
HO [•]	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Li	Lítio
NMDA	N-metil-D-aspartato
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singleto
ONOO ⁻	Peroxinitrito
Na ⁺	Íon sódio
NO	Óxido nítrico
pH	Potencial hidrogeniônico
SH	Sulfidrilas
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TH	Transtornos de humor
THB	Transtorno de humor bipolar
VACHT	Transportador vesicular de acetilcolina

Apresentação

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Revisão de literatura desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido.

Sumário

1 Introdução	14
2 Objetivos	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos	16
3 Revisão de literatura	17
Transtorno de humor bipolar	17
Transtorno de humor bipolar e estresse oxidativo	20
Transtorno de humor bipolar e enzimas envolvidas com a neurotransmissão	22
Mirtilo	25
4 Manuscrito	28
5 Conclusões	56
Referências	57
Anexos	67

1 Introdução

O transtorno de humor bipolar (THB) é uma doença psiquiátrica crônica e altamente debilitante (GHEDIM et al., 2012), em que seus sintomas oscilam entre dois estados de humor opostos: depressão e mania (HIRSCHFELD, 2014). O episódio de mania gera no indivíduo um estado de energia excessiva, associado à euforia, impulsividade e psicose (TANG e WANG, 2012). O THB é uma das principais causas de incapacidade, levando a comprometimento cognitivo e funcional e mortalidade elevada, particularmente a morte por suicídio (GRANDE et al., 2016).

O diagnóstico do THB é essencialmente clínico, a complexidade e a variedade dos sintomas retardam e confundem o mesmo, resultando no atraso do tratamento específico e adequado. O tratamento medicamentoso consiste em restaurar o comportamento, controlar sintomas agudos e prevenir a ocorrência de novos episódios (MORENO, MORENO e RATZKE, 2005), entretanto, a terapia atual utilizada ainda apresenta alguns efeitos adversos e um baixo índice terapêutico. Tendo em vista as opções de tratamento limitadas e o difícil diagnóstico, torna-se necessária uma melhor compreensão da neurobiologia subjacente a esse transtorno, bem como a busca por novos compostos que possam interagir de forma mais específica com os mecanismos envolvidos na patogênese do THB (BEYER e FREUND, 2017).

Os mecanismos neuroquímicos relacionados à fisiopatologia desse transtorno permanecem pouco esclarecidos, entretanto, diversas alterações têm sido evidenciadas. Vários estudos têm consistentemente demonstrado o envolvimento de disfunções mitocondriais e alterações relacionadas ao sistema redox, bem como um desequilíbrio em enzimas relacionadas aos sistemas de neurotransmissão (SIGITOVA et al., 2016).

Nesse contexto, os modelos animais podem ser considerados ferramentas úteis na compreensão dos mecanismos cerebrais associados a essa patologia (BEYER e FREUND, 2017), pois são capazes de mimetizar sintomas e características neuroquímicas e fisiológicas envolvidas no THB. Entretanto, cabe ressaltar que não existem modelos animais capazes de mimetizar a ciclicidade dessa patologia, sendo assim, os modelos utilizados atualmente avaliam somente o episódio maníaco ou o episódio depressivo.

Desta forma, pode-se destacar o modelo animal de mania induzido com cetamina. A cetamina, em doses sub-anestésicas, é capaz de mimetizar alterações comportamentais e neuroquímicas observadas em indivíduos durante um episódio maníaco (GAZAL et al., 2015; VENANCIO et al., 2015; GHEDIM et al., 2012). Este modelo animal de mania vem sendo bastante usado para a compreensão dos eventos biológicos envolvidos, bem como na busca de novos fármacos mais específicos para o tratamento do THB (LOGAN e MCCLUNG, 2016; GHEDIM et al., 2012).

Considerando que distúrbios neurológicos, como o THB, tem um impacto negativo à vida dos indivíduos afetados, se torna essencial à busca por novos agentes neuroprotetores (MARASHLY et al., 2017). Neste contexto, pode-se destacar o mirtilo, o qual se apresenta como uma excelente fonte de compostos bioativos, como as vitaminas, os minerais e os polifenóis, como as antocianinas. As antocianinas são flavonoides abundantes em frutas e legumes e se destacam por possuir alta atividade antioxidante (HE e GIUSTI, 2010), atuar como agentes neuroprotetores (PRIOR e WU, 2006; TSUDA, 2012) e desempenhar atividade anti-inflamatória (MAZZA, 2007; HE e GIUSTI, 2010). Sendo assim, extratos provenientes de frutos de mirtilo podem ser importantes alvos de estudo na busca de novas alternativas terapêuticas para a prevenção de episódios maníacos.

2 Objetivos

Objetivo geral

Investigar os efeitos preventivos do tratamento com extrato de mirtilo e/ou lítio em alterações neuroquímicas induzidas por um modelo experimental de mania.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito preventivo do tratamento com extrato de mirtilo ou lítio ou associação de ambos na hiperlocomoção induzida por um modelo animal de mania.
- Analisar a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos submetidos a um modelo de mania e tratados com extrato de mirtilo ou lítio ou associação de ambos.
- Avaliar o efeito preventivo do tratamento com extrato de mirtilo ou lítio ou associação de ambos nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrito, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sulfidrilas (SH) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos submetidos a um modelo de mania.
- Determinar o efeito preventivo do tratamento com extrato de mirtilo ou lítio ou associação de ambos na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos submetidos a um modelo de mania.

3 Revisão de literatura

Transtorno de humor bipolar

Os transtornos de humor (TH) são problemas relevantes de saúde mental no Brasil e no mundo. Incluem transtornos unipolares (transtornos depressivos) e transtornos bipolares (episódios maníacos, hipomaníacos e depressivos) (*American Psychiatric Association*, 2017).

O transtorno de humor bipolar (THB) é um distúrbio psiquiátrico complexo e grave, que se caracteriza por episódios alternados de depressão e mania ou hipomania. Esta desordem pode ser considerada um problema de saúde pública, apresentando taxas elevadas de déficits psicossociais, hospitalizações e suicídios (KUPFER, 2005). Estimativas mundiais de prevalência nos mostram que o THB afeta aproximadamente 1-4% da população mundial (SAUNDERS e GEDDES, 2016).

O THB é uma categoria que inclui três diferentes condições: tipo I, tipo II e o transtorno ciclotímico (*American Psychiatric Association*, 2017). Comumente, pacientes com THB do tipo I apresentam episódios recorrentes de mania e depressão, o tipo II é caracterizado pela alternância entre episódios de depressão e hipomania, enquanto o transtorno ciclotímico envolve múltiplos períodos de sintomas hipomaníacos e de sintomas depressivos, porém mais brandos (*American Psychiatric Association*, 2017).

Um episódio maníaco é um período de pelo menos uma semana, onde o indivíduo sofre de uma autoestima exagerada, euforia, agressividade, hipersexualidade, se distrai facilmente e possui um comportamento de risco aumentado. Os sintomas hipomaníacos são semelhantes a um episódio maníaco, porém são menos graves e não levam aos grandes problemas que a mania frequentemente causa. O episódio depressivo geralmente é um período de duas semanas, onde o indivíduo sente uma profunda tristeza ou desespero (*American Psychiatric Association*, 2017).

O THB parece ter fortes fatores de risco genético; estudos de familiares de base populacional estimaram uma taxa de hereditariedade de cerca de 58% (SONG et al., 2015). Fatores de risco ambientais, tais como trauma (ETAIN et al., 2013; BRATLIEN et al., 2014), infecção e inflamação parecem contribuir com um menor grau (SEVERANCE et al., 2014).

A quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-5) apresenta uma gama de sintomas que caracterizam e geram o diagnóstico do indivíduo com THB. A sintomatologia é muito heterogênea e depende fortemente do estado do paciente, dificultando o diagnóstico e consequentemente o tratamento precoce, que é importante para reduzir a gravidade da doença (*American Psychiatric Association*, 2017).

O THB é tratável, medicação combinada ou não com psicoterapia são frequentemente usadas para gerenciar o transtorno ao longo do tempo (*American Psychiatric Association*, 2017). O tratamento medicamentoso visa restaurar o comportamento, controlar sintomas agudos e prevenir a ocorrência de novos episódios (MORENO, MORENO e RATZKE, 2005).

O único fármaco aprovado especificamente para o tratamento do THB é o lítio (Li), sendo este um estabilizador de humor crucial para o tratamento de episódios maníacos agudos, terapia profilática e prevenção de suicídios (ALDA, 2015). Entretanto, a incidência de efeitos adversos e um baixo índice terapêutico restringem seus benefícios (MCKNIGHT et al., 2012). Outros fármacos podem ser utilizados para o tratamento deste transtorno, tais como anticonvulsivantes, antipsicóticos típicos e antipsicóticos atípicos (FORNARO et al., 2016; YATHAM et al., 2013).

A fisiopatologia do THB é complexa, multifatorial e os seus mecanismos permanecem pouco esclarecidos. Entretanto, dados da literatura têm apontado que esse transtorno envolve alterações em mecanismos associados a vias de sinalização, atividades de neurotransmissores, neurotrofinas, estresse oxidativo e inflamação, bem como a uma série de disfunções associadas à resiliência celular e aspectos genéticos (SIGITOVA et al., 2016).

A melhoria das opções de tratamento e diagnóstico é crucial, principalmente tendo em vista a alta taxa de tentativas de suicídio em pacientes com THB (NOVICK et al., 2010). A busca por terapias que visam beneficiar o tratamento necessita de um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na fisiopatologia desses transtornos. Dentro desse contexto, os modelos animais que mimetizam sintomas e características neuroquímicas e fisiológicas envolvidas no THB são de extrema importância. Entretanto, cabe ressaltar que não existem modelos animais capazes de mimetizar a alternância entre as fases de depressão e mania.

Nos últimos 10 anos, diversos modelos animais de mania foram desenvolvidos para mimetizar o THB humano. O fenótipo maníaco é geralmente induzido em modelos animais por fármacos, fatores ambientais ou genéticos (SHARMA et al., 2016). Essas intervenções induzem mudanças comportamentais que são análogas aos sintomas maníacos, como o modelo animal de mania induzido por cetamina, que induz uma hiperlocomoção (GHEDIM et al., 2012).

Com base em estudos que sugerem o envolvimento de uma hipofunção glutamatérgica no THB (DICKERSON et al., 2012; RAO et al., 2012) e um relato de caso de indução de mania após terapia com cetamina (RICKE et al., 2011), estudos têm proposto um modelo animal de mania induzida pela cetamina (DEBOM et al., 2016; GHEDIM et al., 2012). A cetamina age sobre o sistema glutamatérgico como um antagonista não-competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (KAPCZINSKI e QUEVEDO, 2016). Os efeitos gerados pela cetamina no organismo variam de acordo com a dose administrada. Estudos demonstram que doses baixas (5 a 10 mg/kg) exibem propriedades antidepressivas (KATALINIC et al., 2013), em doses moderadas (10 a 50 mg/kg) induz hiperlocomoção e disfunção celular (GHEDIM et al., 2012), enquanto que em doses mais elevadas possuem efeito anestésico dissociativo (KATALINIC et al., 2013).

A cetamina, além de ser um antagonista não-competitivo do receptor NMDA, atua sobre uma variedade de sistemas de neurotransmissão, assim como o monoaminérgico. Por inibir receptores NMDA, a administração dessa substância pode estimular a produção e a liberação de dopamina como uma forma compensatória, mimetizando alterações que ocorrem em indivíduos com THB. A cetamina pode ter afinidade com receptores D₂ de dopamina e 5-HT_{2A} de serotonina, além de alterar o transporte desses neurotransmissores. Esse fármaco também promove alterações em canais de Ca²⁺ e Na⁺, interferindo no fluxo de íons, além de induzir estresse oxidativo (KAPCZINSKI e QUEVEDO, 2016).

Os modelos animais de mania são considerados uma ferramenta valiosa na elucidação de mecanismos subjacentes a este complexo estado comportamental, pois permitem a investigação de estruturas cerebrais específicas, bem como alterações comportamentais e bioquímicas que de outro modo seriam impossíveis de serem observadas (SHARMA et al., 2016; GAZAL et al., 2014). Contudo, são úteis na triagem de novos agentes com propriedades estabilizadoras de humor (SHARMA et al., 2016).

Transtorno de humor bipolar e estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo refere-se a um grave desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a defesa antioxidante (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Sies (1991) definiu isso como um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante a favor do primeiro, levando a danos potenciais. Durante o metabolismo energético, temos a formação de espécies reativas, as quais são altamente danosas aos sistemas biológicos (ANGELOVA e ABRAMOV, 2018).

A oxidação é essencial à vida aeróbica e ao metabolismo celular, produzindo, principalmente durante a respiração celular, espécies reativas de forma natural ou por uma disfunção biológica (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). As espécies reativas podem ser oriundas do metabolismo do oxigênio (ERO) ou do nitrogênio (ERN).

As ERO e as ERN são as principais contribuintes para o quadro conhecido por estresse oxidativo. Elas incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) e os não radicais peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL, 2012, 2014; ROBERTS e SINDHU, 2009). Entre as ERN podemos destacar o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Durante a função celular normal, ERO e ERN são mediadores essenciais para vários processos celulares, incluindo respostas imunes, sinalização celular, defesa microbiana, diferenciação e adesão celular (BAE et al., 2011). Entretanto, quando em excesso no organismo podem causar injúrias celulares, como a peroxidação de lipídeos, proteínas e DNA (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

A fim de evitar os efeitos deletérios das espécies reativas, o organismo apresenta mecanismos de proteção, conhecidos como antioxidantes. Halliwell e Gutteridge (1999) definiram um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasam significativamente ou impedem a oxidação desse substrato.

Em circunstâncias normais, as espécies reativas podem ser eliminadas por defesas antioxidantes enzimáticas e antioxidantes não-enzimáticas (ANDREZZA et al., 2008). Dentre as principais defesas enzimáticas encontram-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutational peroxidase (GPx). As defesas antioxidantes não-enzimáticas incluem a glutational reduzida (GSH), o ácido

ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e os polifenóis (MATTERA et al., 2017).

As enzimas SOD, CAT e GPx trabalham em conjunto. A SOD está envolvida na dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio molecular e H_2O_2 . Já a CAT promove a decomposição de H_2O_2 em água e oxigênio molecular. A GPx é um nome geral de uma família de enzimas envolvidas na remoção de H_2O_2 nos tecidos; elas utilizam GSH como substrato para converter peróxidos e hidroperóxido em álcoois, água e glutathiona oxidada (LOWE, 2014; ANDREAZZA et al., 2008) (Figura 1).

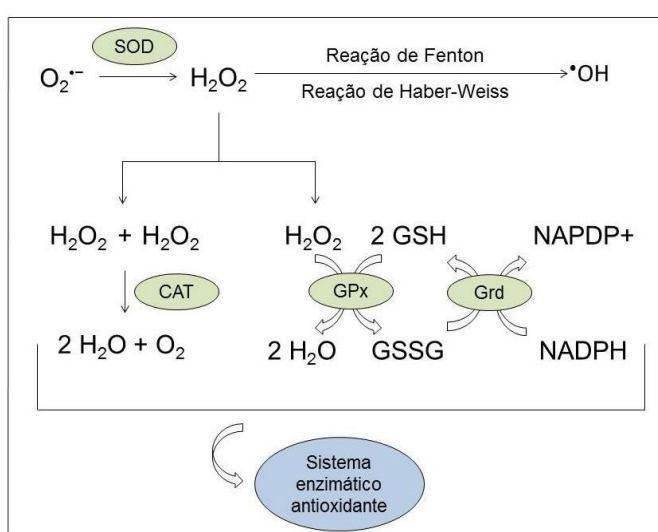


FIGURA 1 - Mecanismo enzimático antioxidante (Adaptado de BARBOSA et al., 2010).

Em condições normais, há um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e os mecanismos de defesa de um organismo. Em condições patológicas, pode ocorrer um aumento acentuado da produção de espécies reativas, sobrepondo as defesas antioxidantes, causando o quadro de estresse oxidativo.

Todos os tecidos são suscetíveis ao dano oxidativo, entretanto, sabe-se que o cérebro é particularmente propenso a lesão oxidativa devido ao seu elevado consumo de oxigênio, presença de neurotransmissores auto-oxidáveis, alto teor de ácidos graxos peroxidáveis e limitada capacidade antioxidante (TER-MINASSIAN, 2006; BERK et al., 2011). O aumento do estresse oxidativo neuronal induz efeitos deletérios na transdução do sinal, na resiliência celular e na plasticidade estrutural, principalmente por ativação da degradação oxidativa de lipídios nas membranas plasmáticas (MACHADO-VIEIRA et al., 2007; MACHADO-VIEIRA, 2017). O estresse oxidativo medeia processos neurológicos de diversas patologias psiquiátricas,

incluindo o THB (SOUZA et al., 2014; ANDREAZZA et al., 2008; GERGERLIOGLU et al., 2007), como evidenciado pelo alto dano oxidativo sistêmico observado em portadores (BERK, et al., 2011; ANDREAZZA, et al., 2010).

Uma das principais evidências é demonstrada pelo aumento da peroxidação lipídica, indicada pelos níveis de TBARS no soro de pacientes e alterações em enzimas antioxidantes séricas, tais como SOD, CAT e GPx em pacientes com THB (FREY et al., 2006). Estudos pré-clínicos realizados com modelos animais de mania sugerem que o estresse oxidativo é uma característica importante associada à neurodegeneração e alterações comportamentais observadas nesses modelos (GHEDIM et al., 2012; FREY et al., 2006). Além disso, alterações a nível cerebral têm sido relatadas em modelos animais de mania, marcadamente pelo aumento dos níveis de TBARS e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes (DEBOM et al., 2016; SOUZA et al., 2014).

Transtorno de humor bipolar e enzimas envolvidas com a neurotransmissão

A desordem bipolar permanece com a sua fisiopatologia pouco esclarecida, porém, já foi demonstrado que a mesma está associada com disfunção mitocondrial (KATO e KATO, 2000), bem como com alterações em vias intracelulares que regulam a transmissão, a plasticidade e a sobrevivência neuronal (COYLE e DUMAN, 2003). A disfunção mitocondrial está estritamente relacionada com o metabolismo energético do organismo, assim como a enzima Na^+, K^+ -ATPase (ZUGNO et al., 2009).

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína integral de membrana e é encontrada na maioria das células dos eucariotos. É responsável pelo transporte de íons sódio e de íons potássio contra seu gradiente de concentração, fazendo uso da energia da hidrólise do ATP (APERIA, 2007) e produzindo um gradiente eletroquímico através da membrana celular (CASTRO et al., 2014; APERIA, 2007). Está presente em elevadas concentrações no cérebro, consumindo cerca de 40-50% do ATP gerado nesse tecido. No SNC atua mantendo a excitabilidade neuronal através da geração de potencial de membrana, além de regular o volume celular, o pH intracelular e o fluxo de íons (ERECINSKA e SILVER, 1994).

A Na^+, K^+ -ATPase apresenta um mecanismo de ação complexo, composto por quatro etapas fundamentais que envolvem dois estados conformacionais, um

estado desfosforilado, com alta afinidade por sódio (E1), e outro fosforilado, com alta afinidade por potássio (E2) (GLYNN, 1993). Primeiramente, três íons sódio e o ATP se ligam à Na^+, K^+ -ATPase, a enzima é, então, fosforilada pelo ATP. Com a mudança conformacional provocada pela fosforilação, os sítios de ligação dos íons sódio são expostos ocorrendo à liberação desses ao meio extracelular. Posteriormente, dois íons potássio ligam-se em sítios de alta afinidade da Na^+, K^+ -ATPase e o fosfato inorgânico é liberado. A desfosforilação da enzima causa outra mudança conformacional, reduzindo a afinidade pelo potássio e liberando dois íons ao meio intracelular (GLYNN, 1993; KAPLAN, 2002) (Figura 2).

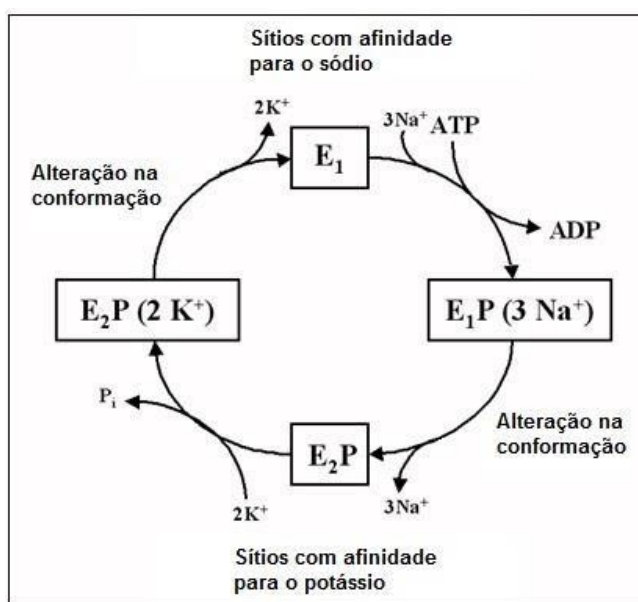


Figura 2 - Mecanismo de ação da enzima Na^+, K^+ -ATPase (Adaptado de GLYNN, 1993).

Estudos com modelos animais já demonstraram que a atividade dessa enzima está alterada em distúrbios psiquiátricos, como na depressão (GAMARO et al., 2003) e no THB (ZUGNO et al., 2009). O trabalho desenvolvido por Zugno et al., (2009) demonstra que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está aumentada em animais que receberam a administração de anfetamina, droga que é capaz de induzir o episódio maníaco. Além disso, a administração de lítio ou valproato foi capaz de prevenir e também reverter essa alteração.

Considerando que a enzima Na^+, K^+ -ATPase desempenha papel essencial no metabolismo energético cerebral (ZUGNO et al., 2009) e que a disfunção mitocondrial está envolvida na fisiopatologia do THB (SIGITOVA et al., 2016), é

possível sugerir que alterações nessa enzima possam ocorrer durante os diferentes episódios dessa patologia.

Além disso, cabe ressaltar também que o THB é capaz de alterar outros sistemas de neurotransmissores (SIGITOVA et al., 2016), dentre estes o sistema colinérgico. O sistema colinérgico é mediado pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), o qual é amplamente distribuído no SNC e periférico (PATEL et al., 2018), uma vez que quase todas as regiões cerebrais são inervadas por neurônios colinérgicos (WOOLF e BUTCHER, 2011). A neurotransmissão colinérgica é responsável pela modulação de importantes funções neurais como atenção, aprendizagem, memória, resposta ao estresse, vigília e sono, além de estar relacionada com transtornos neuropsiquiátricos (OBERMAYER et al., 2017).

A ACh é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) por dois diferentes precursores, acetil-CoA e colina. Posteriormente, o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) leva o neurotransmissor até as vesículas sinápticas. Após ocorrer a despolarização no neurônio pré-sináptico, ACh sofre exocitose atingindo a fenda sináptica, onde pode se ligar a receptores, os quais podem ser receptores muscarínicos ou nicotínicos. ACh estando na fenda sináptica poderá ser hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), formando acetato e colina, que serão reciclados no terminal do nervo pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (ChT) (FERREIRA-VIANA et al., 2016) (Figura 3).

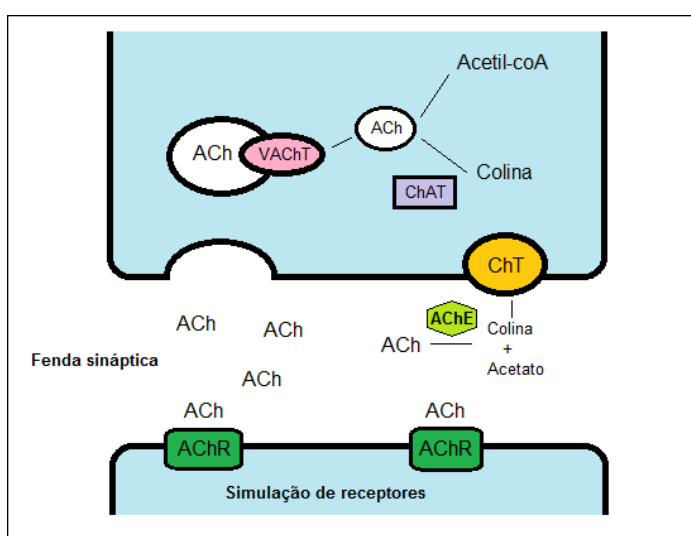


Figura 3 - Neurotransmissão colinérgica. ChT - Transportador de colina; ChAT - Colina acetiltransferase; VACHT - Transportador vesicular de acetilcolina; ACh - Acetilcolina; AChE - Acetilcolinesterase; AChR - Receptor de acetilcolina (Adaptado de POHANKA, 2012).

A AChE é uma serina hidrolase que catalisa a hidrólise específica da ACh em acetato e colina, regulando a concentração desse neurotransmissor na fenda sináptica. Essa enzima possui uma unidade catalítica conhecida por tríade, composta pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327) que se localizam no interior da enzima (SOREQ e SEIDMAN, 2001).

Dentro desse contexto, acredita-se que a atividade colinérgica anormal está envolvida com várias doenças do SNC, como o THB e a doença de Alzheimer (JOPE et al., 1986). Um aumento da atividade da AChE pode levar a uma diminuição do nível de ACh, o que pode contribuir para alterações neurológicas no episódio maníaco (CUMMINGS, 2000). Além disso, já foi relatado que fármacos capazes de inibir a atividade da AChE podem ser benéficos no tratamento de distúrbios psiquiátricos (DIGBY et al., 2012).

Mirtilo

A nutrição moderna é considerada um tema multidisciplinar que converge com a epidemiologia, bioquímica, química, ciência comportamental, biologia, ciência alimentar e a medicina. Tem sido atribuída a alimentação, não somente a função nutricional e o apelo sensorial, mas também benefícios fisiológicos que o alimento pode produzir, visando a prevenção, a melhora ou até mesmo a cura de diversas patologias (WILLIAMSON, 2017).

Nesse contexto, podemos destacar os alimentos funcionais, os quais são conceituados como alimentos que possuem funções nutricionais básicas e, além disso, possuem a capacidade de promover efeitos benéficos à saúde (ANVISA 1999a e 1999b). Dentre os alimentos funcionais, têm-se as frutas - especialmente as bagas - as quais são uma fonte rica de vários fitoquímicos e nutrientes que podem explicar os seus efeitos fisiológicos (BASU, SCHELL e SCOFIELD, 2017). Dentro desse contexto, podemos destacar o mirtilo.

O mirtilo, também conhecido por *blueberry*, pertence a família das Ericaceae e ao gênero *Vaccinium*. Está incluído no grupo das pequenas frutas, juntamente com a amora, framboesa e morango e caracteriza-se por sua coloração azul-escura. É nativo de regiões da Europa e dos Estados Unidos, onde costuma ser bastante cultivado e comercializado (FACHINELLO, 2008). No Brasil, a sua introdução foi realizada no ano de 1983, através de uma coleção de plantas trazidas pela Embrapa

Clima Temperado localizada no município de Pelotas, no Rio Grande do Sul (HOFFMANN, 2014).

O mirtilo tem em sua constituição mais de 80% de água, além de açúcares, ácido cítrico, ácido málico, vitaminas A e C e minerais como o manganês, potássio e ferro (WANG, CAMP e EHLENFELDT, 2012). Essa baga vem ganhando popularidade devido as suas excelentes propriedades benéficas à saúde e a sua composição rica em polifenóis (SINELLI et al., 2008).

Os compostos fenólicos ou polifenóis apresentam estruturas químicas variadas, possuem pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático. Historicamente, os polifenóis eram principalmente de interesse para os botânicos, pois desempenham vários papéis nas plantas e fazem parte da classe de metabolitos secundários ou fitoquímicos (WILLIAMSON, 2017). Os polifenóis se enquadram em diversas categorias, como ácidos fenólicos, estilbenos e flavonoides, os quais podem atuar como agentes redutores, neutralizadores de radicais livres ou desativadores do oxigênio singlete (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; MELO e GUERRA, 2002).

Dentre os polifenóis, podemos destacar os flavonoides, os quais possuem considerável interesse científico e terapêutico. São compostos de origem vegetal e possuem uma estrutura fenólica variável (SILVA et al., 2015). As principais classes são as flavonas, flavonóis, isoflavonoides e as antocianinas (LAZARY, 2010). Estas classes polifenólicas têm se destacado por suas mais diversas propriedades, já demonstraram ter ação terapêutica, como por exemplo, ao sistema imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso (GEORGIEV, ANANGA e TSOLOVA, 2014).

As antocianinas (do grego *anthos* - flor e *kianos* - azul) são pigmentos naturais que fazem parte da família dos flavonoides (QUIDEAU et al., 2011). Ocorrem em todos os tecidos das plantas e são responsáveis pelas cores vermelho-alaranjado, rosa, vermelho, violeta, azul e roxo (MARTÍN, DÍAZ-MONTAÑA e ASUERO, 2017). As antocianinas são derivadas das antocianidinas, as quais não possuem grupos glicosídeos, já nas antocianinas, uma ou mais hidroxilas estão ligadas a açúcares (MARÇO, POPPI e SCARMINIO, 2008). A Figura 4 representa a estrutura geral de uma antocianina.

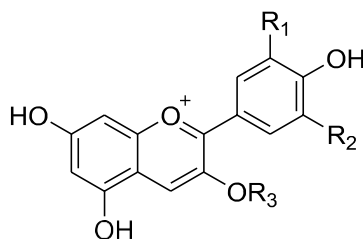


Figura 4 - Estrutura geral das antocianinas (Adaptado de FERNANDES et al., 2012).

As antocianinas ocorrem amplamente em alimentos derivados de plantas, sendo assim, são abundantes na dieta humana (FERNANDES et al., 2012). Quanto a sua biodisponibilidade e metabolismo, as mesmas possuem diferenças quando comparadas com outros flavonoides, pois podem sofrer alterações em resposta ao pH e temperatura (BROUILLARD e DUBOIS, 1977). Elas são absorvidas a nível gástrico e intestinal, mas também podem ser metabolizadas no cólon (FERNANDES et al., 2012). Podem ser detectadas em diferentes estruturas, como no córtex cerebral e no cerebelo, demonstrando assim, sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (KALT et al., 2008).

Diversos estudos têm descrito propriedades biológicas e fatores benéficos à saúde que podem estar associados ao consumo de mirtilo, o que pode estar relacionado com o alto teor de polifenóis encontrados nesse fruto (SINELLI et al., 2008). Entre as pesquisas realizadas, podemos destacar o estudo *in vivo* desenvolvido por Debom et al., (2016), onde foi avaliado o efeito protetor de um extrato de mirtilo frente a alterações induzidas por um modelo animal de mania. Foi observado nesse estudo que o extrato de mirtilo foi capaz de prevenir efeitos pró-oxidantes, bem como inflamatórios, sugerindo um papel neuroprotetor associado ao consumo desse fruto. Tem sido demonstrado também que o consumo normal de mirtilo colabora na melhora clínica de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e Parkinson (SUBASH et al., 2014).

Assim, é possível sugerir que intervenções nutricionais ricas em fitoquímicos, as quais estão presentes em frutas como o mirtilo, podem ser importantes alvos de estudos na busca de novas abordagens terapêuticas para o THB.

4 Manuscrito

Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects

Luiza Spohr^a, Mayara Sandrielly Pereira Soares^a, Pathise Souto Oliveira^a, Bruna da Silveira de Mattos^a, Natália Pontes Bona^a, Nathalia Stark Pedra^a, Fernanda Cardoso Teixeira^a, Carlus Augustu Tavares do Couto^a, Vitor Clasen Chaves^b, Flávio Henrique Reginatto^b, Claiton Leoneti Lencina^c, Francieli Moro Stefanello^a, Roselia Maria Spanevello^{a*}

O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido: Psychopharmacology

Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects

Luiza Spohr^a, Mayara Sandrielly Pereira Soares^a, Pathise Souto Oliveira^a, Bruna da Silveira de Mattos^a, Natália Pontes Bona^a, Nathalia Stark Pedra^a, Fernanda Cardoso Teixeira^a, Carlus Augustu Tavares do Couto^a, Vitor Clasen Chaves^b, Flávio Henrique Reginatto^b, Claiton Leoneti Lencina^c, Francieli Moro Stefanello^a, Roselia Maria Spanevello^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^c Curso de Farmácia, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding author**

Roselia Maria Spanevello

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/Bioquímica, Prédio 29, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/n, CEP 9601090, Caixa Postal 354, Pelotas, RS, Brazil.

Phone: +55 53 32757355

Email: roselia.spanevello@ufpel.edu.br

Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Abstract

Rationale: Bipolar disorder is a psychiatric disease characterized by recurrent episodes of mania and depression. Blueberries contain bioactive compounds with important pharmacological effects such as neuroprotective and antioxidant actions. **Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of blueberry extract and/or lithium on oxidative stress, and acetylcholinesterase (AChE) and Na^+, K^+ -ATPase activity in an experimental ketamine-induced model of mania. **Methods:** Male Wistar rats were pretreated with vehicle, blueberry extract (200 mg/kg), and/or lithium (45 mg/kg or 22.5 mg/kg twice daily) for 14 days. Between the 8th and 14th days, the animals also received an injection of ketamine (25 mg/kg) or vehicle. On the 15th day the animals received a single injection of ketamine; after 30 minutes, the locomotor activity was evaluated in an open field test. **Results:** Ketamine administration induced an increase in locomotor activity. In the cerebral cortex, hippocampus and striatum, ketamine also induced an increase in reactive oxygen species, lipid peroxidation and nitrite levels, as well a decrease in antioxidant enzyme activity. Pretreatment with blueberry extract or lithium was able to prevent this change. Ketamine increased the AChE and Na^+, K^+ -ATPase activity in brain structures, while the blueberry extract partially prevented these alterations. In addition, our results showed that the neuroprotective effect was not potentiated when lithium and blueberry extract treatment were given together. **Conclusion:** In conclusion, our findings suggest that blueberry extract has a neuroprotective effect against an experimental model of mania. However, more studies should be performed to evaluate its effects as an adjuvant therapy.

Keywords: bipolar disorder; hyperlocomotion; anthocyanins; oxidative stress; acetylcholinesterase; Na^+, K^+ -ATPase.

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is one of the most debilitating mental illnesses, characterized by recurrent episodes of elevated mood, mania, and depression, interspersed with periods of euthymia (Phillips and Kupfer 2013). This disorder is associated with a significant mortality and morbidity, with high rates of suicide and medical comorbidities (Sagar and Pattanayak 2017) and is among the leading causes of disability worldwide (Walker et al. 2015). In manic episodes, people undergo from exaggerated self-esteem, less need to sleep, is easily distracted, hyperactivity and has increased risk behavior (Phillips and Kupfer 2013).

The pathophysiology of this disorder is complex and multifactorial, and its mechanisms remain unclear. However, studies have demonstrated that mitochondrial dysfunction, disturbances in neurotransmitters systems, alterations in membrane transport, and oxidative stress seem to play important roles in the pathogenesis of BD (Sigitova et al. 2016).

Oxidative stress is characterized as an imbalance between antioxidant and pro-oxidant processes, resulting in the increase in reactive species levels which have potential to cause cellular damage (Adam-Vizi and Chinopoulos 2006). Biomarkers of oxidative stress, such as an increase in lipid peroxidation and decrease in antioxidant defenses, have been described in BD patients (Mansur et al. 2016; Chowdhury et al. 2017), indicating that free radicals are involved in neurochemical changes in this psychiatric disorder.

Brain oxidative stress damage also may alter the structure and function of crucial enzymes such as acetylcholinesterase (AChE) and Na^+, K^+ -ATPase (Dobrota et al. 1999). AChE is the main enzyme involved in the degradation of the neurotransmitter acetylcholine, while the Na^+, K^+ -ATPase is responsible for electrochemical gradients across the neuronal membranes by regulating the entry of K^+ and exit of Na^+ from cells (Erecinska and Silver 1994; Zugno et al. 2009; Arnaiz and Ordieres 2014). As a consequence of their key physiological roles, the activity of these enzymes has been studied in different pathological and experimental conditions (Cho 1995; Zugno et al. 2009; Carvalho et al. 2012; Gutierrez et al. 2014). Thus, molecules capable of modulating the Na^+, K^+ -ATPase and AChE enzymes increase the possibility to develop new therapeutic strategies for reducing the severity and complications of BD.

Lithium is one of the most widely used drugs in the treatment of BD. Studies have demonstrated that this drug has neuroprotective effects by significantly reducing the severity and frequency of mania, and preventing bipolar depression and suicide (Moreno et al. 2005; Fornaro et al. 2016). However, side effects and low therapeutic index are well-recognized limitations for lithium monotherapy in BD.

In recent years, considerable attention has been directed towards the identification of natural compounds that may be used for human health promotion and disease prevention. Blueberry (*Vaccinium* spp.) has gained worldwide interest as it contains various bioactive compounds (Wu et al. 2017) that may have potent biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions (Gutierrez et al. 2014; Debom et al. 2016). Thus, the consumption of diets enriched with polyphenols may present new perspectives for the prevention or treatment of neuropsychiatric diseases (Gazal et al. 2014; Debom et al. 2016).

Considering that BD is one of the most debilitating psychiatric diseases and that its therapy has many adverse effects, this study aims to evaluate the potential therapeutic of blueberry extract on AChE and Na^+, K^+ -ATPase activities and oxidative stress parameters in brain regions of rats submitted to ketamine-induced model of mania. In addition, we also evaluated the effects of the joint blueberry extract and lithium treatment.

2. Material and methods

Chemicals

Acetylthiocholine iodide (AcSCh), Coomassie Brilliant Blue G, Trizma Base, thiobarbituric acid, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), epinephrine and ouabain octahydrate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Trichloroacetic acid and hydrogen peroxide were purchased from Synth® (Brazil). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

Blueberry extract preparation and phytochemical determination

Extraction

Fruits of *Vaccinium virgatum* were harvested at Embrapa Clima Temperado (Brazilian Agricultural Research Corporation) Pelotas/RS, Brazil (31°40'47"S and 52°26'24"W). After collection, the fruit were stored at -20°C until the extraction process. The extract was prepared according to Bordignon et al. (2009). Briefly, 30 g of unprocessed blueberries were weighed and sonicated for 30 min at 25°C in 90 mL 70:30 v/v ethanol-water (pH 1.0). The extracts were filtered, the ethanol removed under reduced pressure, and then lyophilized until dry. These procedures were performed in triplicate and sheltered from light.

LC/MS and anthocyanin identification

Anthocyanins were individually identified using liquid chromatography (Acquity-UPLC™) coupled to a photodiode array detector (PDA) and a high-resolution mass spectrometer (Xevo® G2 QToF model – WATERS®) equipped with an electrospray ionization source (ESI) operating in positive mode. The chromatographic separation was performed using a Synergi™ Polar-RP column (Phenomenex® - id 4 µm, 150 × 2.0 mm) at 40°C and the injection volume was set at 5 µL. The elution was performed using an aqueous phase consisting of 2% formic acid (solvent A) and acetonitrile containing 1% formic acid (solvent B). A linear gradient according to the following conditions was used: 0–10 min, 5–12% B; 10–29 min, 12–18% B; 29–33 min, 18% B; 33–34 min, 5% B with a constant flow of 0.4 mL/min. The detection was performed at 520 nm, and the range of spectral scanning in the visible region ranged from 450 to 600 nm (PDA). Mass scanning ranged from *m/z* 200 to 1500 with a scan time of 0.5 s. MS/MS analyses were performed using a collision energy ramp (10–30 eV) with argon as the collision gas. A capillary voltage of 1.0 kV, source block temperature of 120°C, desolvation temperature of 600°C; nebulizer nitrogen flow rate of 80 L/h, desolvation nitrogen gas flow of 800 L/h, and cone voltage of 40 V were used controlled by MassLynx v.4.1 software for data acquisition and processing. All samples were analyzed in triplicate.

Animals

Adult male Wistar rats (60 days, 250–300 g) were obtained from the Central Animal House of Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. The animals were housed in standard cages at an ambient temperature of 23 ± 1°C, with 12 h light/dark cycles and free access to water and food. The Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil, under protocol number CEEA 9085-2016, approved all animal procedures. The use of animals was in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care

and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), which is in agreement with the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Animal model of mania and prevention protocol with blueberry extract and/or lithium

Sixty animals were divided into six groups (n=10): I (vehicle, saline), II (ketamine, 25 mg/kg), III (ketamine 25 mg/kg + lithium 45 mg/kg), IV (ketamine 25 mg/kg + blueberry extract 200 mg/kg), V (ketamine 25 mg/kg + lithium 45 mg/kg + blueberry extract 200 mg/kg), and VI (ketamine 25 mg/kg + lithium 22.5 mg/kg + blueberry extract 200 mg/kg). The animals in groups IV, V, and VI received the blueberry extract orally, while the animals of III, V, and VI received lithium (twice a day). The animals in groups I and II received the same volume of saline solution. From the 8th to the 14th day, the animals in groups II, III, IV, V, and VI also received ketamine treatment, while group I received vehicle intraperitoneally. On the 15th day of treatment, the animals received a single injection of ketamine or saline. Thirty minutes later, the locomotor activity was assessed in an open-field apparatus (Figure 1). The blueberry extract, lithium, and ketamine dosages and treatment times were based on previous studies described in the literature (Ghedim et al. 2012; Gazal et al. 2014, Debom et al. 2016).

Open-field test

Locomotor behavior was evaluated using an open-field apparatus (Gazal et al. 2014, Debom et al. 2016). The apparatus consisted of a wooden box measuring 72 × 72 × 33 cm (width × length × height), with the floor divided into 16 equal squares (18 × 18 cm). The number of quadrants crossed over a period of 5 minutes was the parameter used to evaluate locomotor activity. The apparatus was cleaned with 40% ethanol and dried after each individual animal session.

Brain tissue preparation

After the open field test, the animals were euthanized by decapitation and the brain was collected and the cerebral cortex, striatum, and hippocampus were dissected. The brain structures were homogenized in specific buffer and centrifuged. The supernatant was used for all biochemical determinations.

Acetylcholinesterase (AChE) activity assay

AChE activity was determined as previously described by Ellman et al. (1961). The reaction system, composed of 10 mM DTNB, 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), and 15 µL homogenate was incubated for 2 min at 27°C. After this, 8 mM AcSCh was added to the reaction. The absorbance was read using a spectrophotometer at 412 nm for 2 min at 25°C. AChE activity was expressed as µmol AcSCh/h/mg of protein.

Na⁺,K⁺-ATPase activity assay

Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured as previously described by Carvalho et al. (2012). The reaction mixture for the Na⁺,K⁺-ATPase activity assay contained 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA, and 30 mM Tris-HCl, pH 7.4. After 10 min pre-incubation at 37°C, the reaction was initiated by the addition of ATP to a final concentration of 3 mM and incubated for 30 min. Control experiments were carried with the addition of 1 mM ouabain. Released inorganic phosphate (Pi) was measured using the malachite green method (Chan et al. 1986). Na⁺, K⁺-ATPase activity was expressed as pg Pi/mg protein/minute.

Brain oxidative stress assays

Oxygen reactive species (ROS) assay

The oxidation of DCFH-DA to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was measured to detect intracellular reactive oxygen species. DCF fluorescence intensity was recorded using excitation at 488 nm and emission at 525 nm 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium. ROS formation was determined according to Ali et al. (1992) with some modifications and was expressed as $\mu\text{mol DCF/mg protein}$.

Nitrite levels assay

Nitrite levels were assessed as per Stuehr and Nathan (1989). The supernatants were used in a colorimetric reaction with Griess reagent, where 50 μl sulphanilamide in 5% phosphoric acid was added to 50 μl supernatant. After 10 minutes, samples were mixed with 100 μl N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride and incubated for 10 minutes in the dark. The absorbance was measured at 540 nm and the amount of nitrite is expressed as $\mu\text{mol nitrite/mg of protein}$.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) quantification

Lipid peroxidation was quantified using TBARS, according to Esterbauer and Cheeseman's (1990) method. First, homogenates were mixed with 15% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. This mixture was heated for 30 minutes at 95°C and then cooled for 10 minutes. TBARS was determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as $\text{nmol TBARS/mg protein}$.

Total sulphydryl content (SH content) quantification

This assay, performed as described by Aksenov and Markesbery (2001), was based on the reduction of DTNB by thiols, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured in the spectrophotometer at 412 nm. Homogenates were added to PBS buffer, pH 7.4, containing EDTA. The reaction was started by the addition of DTNB. Results were expressed as $\text{nmol TNB/mg protein}$.

Superoxide dismutase (SOD) activity

This assay is based on the inhibition of the autoxidation of adrenaline in a spectrophotometer at 480 nm. The intermediate reaction produces superoxide, which is scavenged by SOD. One SOD unit was defined as the enzyme amount to cause 50% inhibition of adrenaline autoxidation. Total SOD activity was measured using the method described by Misra and Fridovich (1972) and the specific activity of SOD is expressed as units/mg protein .

Catalase (CAT) activity

CAT activity was determined using the method described by Aebi (1984). The reduction in the amount of H_2O_2 was monitored for 180 seconds using a spectrophotometer at 240 nm at 37°C. One unit of the enzyme is defined as the amount required to consume one nmol of H_2O_2 per minute and the specific activity is expressed as units/mg protein .

Glutathione S-transferase (GST) activity assay

GST activity was determined according to the method of Habig et al. (1974), which uses 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate. The activity is expressed as $\mu\text{mol GS-DNB min/mg protein}$.

Protein determination

For SOD, CAT, and GST activity, and TBARS and total sulfhydryl content levels, the protein levels were measured using the method detailed by Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as the standard. For Na^+, K^+ -ATPase and AChE activity, and ROS and nitrite levels, the protein levels were measured using the Coomassie blue method according to Bradford (1976), with bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Data were analyzed using analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test. $P \leq 0.05$ was considered to represent a significant difference in the analysis. All data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M.

3. Results

Anthocyanin identification in blueberry extract

Anthocyanin identification was based on the fragmentation pattern and exact mass. Five aglycone fragments were identified: cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin, and malvidin. The aglycone fragmentation pattern and exact mass identified fifteen monoglycosylated anthocyanins (Table 1).

Open-field test

Ketamine treatment induced hyperlocomotion in rats ($P < 0.05$), as represented by an increase in the number of crossings in the open field test. Pretreatment with lithium-alone (45 mg/kg) ($P < 0.001$), blueberry extract-alone (200 mg/kg) ($P < 0.01$), and lithium (45 mg/kg) plus blueberry extract (200 mg/kg) ($P < 0.01$) prevented this increase. Co-treatment with lithium (22.5 mg/kg) plus blueberry extract (200 mg/kg) was not able to prevent this behavioral change ($P > 0.05$) (Figure 2).

Acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum

In the cerebral cortex, no change in AChE activity was observed in the animals treated only with ketamine; however, an increase in enzyme activity was observed in animals treated with both lithium and blueberry extract ($P < 0.01$; Figure 3). In the hippocampus and striatum, an increase in AChE activity was observed in the ketamine group ($P < 0.05$). Both lithium ($P < 0.05$) and blueberry extract ($P < 0.05$) treatments were able to prevent this alteration (Figure 3). Lithium and blueberry extract co-treatment was not effective in preventing the changes in AChE activity induced by ketamine administration in the hippocampus and striatum of rats (Figure 3).

Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum

In the cerebral cortex, our results show an increase in Na^+, K^+ -ATPase activity in the ketamine group ($P < 0.05$); treatment with lithium-alone ($P < 0.01$) and blueberry extract-alone ($P < 0.01$) were able to prevent this alteration (Figure 4). In the hippocampus, an increase in Na^+, K^+ -ATPase activity was observed in the ketamine group ($P < 0.05$); only lithium (22.5 mg/kg) and blueberry extract (200 mg/kg) co-treatment was able to prevent

this ketamine-induced change ($P<0.001$). In the striatum, an increase in Na^+, K^+ -ATPase activity in the ketamine group ($P<0.05$) was observed; treatment with lithium-alone ($P<0.05$), blueberry extract-alone ($P<0.05$), and lithium (45 mg/kg) plus blueberry extract (200 mg/kg) ($P<0.001$) were able to prevent this alteration (Figure 4).

Oxidative stress parameters in the cerebral cortex

Figure 5 shows that ketamine caused an increase in ROS levels ($P<0.05$); pretreatment with lithium-alone ($P<0.001$) and blueberry extract-alone ($P<0.01$) were able to prevent this increase. The administration of both treatments together was not effective in preventing the increase in ROS levels induced by ketamine (Figure 5). Treatment with lithium-alone ($P<0.05$), blueberry extract-alone ($P<0.01$), and lithium (45 mg/kg) plus blueberry extract ($P<0.05$) prevented the increase in the TBARS levels induced by ketamine administration ($P<0.05$). In all experimental groups evaluated, no significant changes were observed in nitrite levels in the cerebral cortex.

Pretreatment with lithium-alone ($P<0.01$), blueberry extract-alone ($P<0.05$), and lithium and blueberry extract together ($P<0.05$) prevented the decrease in the total sulfhydryl content induced by ketamine. Ketamine also caused a decrease in the SOD activity ($P<0.05$), while lithium-alone ($P<0.05$) and blueberry extract-alone ($P<0.05$) pretreatment were effective in preventing this alteration. Similar results were observed in the catalase activity in the ketamine group ($P<0.05$); again, this change was prevented by pretreatment with lithium-alone ($P<0.05$), blueberry extract-alone ($P<0.05$), and lithium (45 mg/kg or 22.5 mg/kg) and blueberry extract together ($P<0.01$).

Oxidative stress parameters in the hippocampus

In the hippocampus, ketamine administration also caused an increase in ROS levels ($P<0.05$). Only pretreatment with blueberry extract-alone was able to prevent this alteration ($P<0.01$). In the hippocampus, ketamine increased the TBARS levels; pretreatment with lithium-alone ($P<0.05$), blueberry extract-alone ($P<0.01$) and lithium (45 mg/kg) plus blueberry extract (200 mg/kg) ($P<0.01$) were able to prevent this alteration (Figure 6). In relation to antioxidant enzymes, our results show that ketamine induced a decrease in SOD and CAT activity in the hippocampus when compared with the control group ($P<0.05$). It is important to note that all treatments evaluated in this study could prevent the alterations in CAT activity, while only the lithium-alone ($P<0.001$), blueberry extract-alone ($P<0.001$) and lithium (45 mg/kg) plus blueberry extract ($P<0.001$) pretreatment were able to restore SOD activity when compared with the ketamine group (Figure 6). No changes were observed in the nitrite levels or total sulfhydryl content in the hippocampus (Figure 6).

Oxidative stress parameters in the striatum

In the striatum, ketamine induced an increase in ROS ($P<0.05$) and nitrite ($P<0.05$) levels when compared with the control group (Figure 7). Pretreatment with lithium-alone, blueberry extract-alone, and both together prevented these alterations to similar levels ($P<0.05$) (Figure 7). Lithium-alone ($P<0.05$) and blueberry extract-alone ($P<0.05$) pretreatment also prevented the increase in TBARS levels induced by ketamine ($P<0.05$). In all experimental groups evaluated, no changes were observed in the total sulfhydryl content in the striatum. Ketamine administration did not alter the SOD or CAT activity in the rat striatum ($P>0.05$), however, our results showed a decrease in the SOD activity in the groups treated with lithium (45 mg/kg or 22.5 mg/kg) and

blueberry extract together ($P<0.05$). In addition, an increase in the CAT activity was observed only in the striatum of animals treated with lithium (45 mg/kg) plus blueberry extract ($P<0.001$) (Figure 7).

Glutathione S-transferase (GST) activity in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum

Figure 8 shows that ketamine causes an increase in the activity of the GST enzyme in cerebral cortex ($P<0.05$). Pretreatment with lithium, blueberry extract, and both together were able to prevent these alterations to similar extents ($P<0.05$) (Figure 8). In the hippocampus, an increase in GST activity was observed only in the animals pretreated with lithium (22.5 mg/kg) plus blueberry extract when compared with the other groups ($P<0.05$). No changes were observed in GST activity in the striatum ($P>0.05$) (Figure 8).

4. Discussion

In the present study we evaluated the therapeutic potential of blueberry extract, as well as its effects when administered together with lithium, on neurochemical and behavior changes induced by an animal model of mania.

The animal model of mania induced by ketamine is an experimental model used for the elucidation of neurological dysfunctions in manic episodes. Ketamine is a non-competitive N-methyl-D aspartate (NMDA) receptor antagonist capable of affecting a variety of receptors and cellular processes (Kapczinski and Quevedo 2016). Ketamine at subanesthetic doses alters mitochondrial respiratory chain activity in various brain structures (De Oliveira et al. 2011) and induces neurotoxicity in primary neuronal culture (Wang et al. 2008). Here, our results showed that ketamine induces hyperactivity in rats, similar to behavior observed in individuals with BD during a manic episode (Nestler and Hyman 2010; Dickerson et al. 2012). These findings are consistent with previous studies that also demonstrated that blueberry extract or lithium treatment were capable of preventing hyperlocomotion induced by ketamine (Debom et al. 2016).

Regarding the brain enzymes, ketamine induced an increase in AChE activity in the hippocampus and striatum. These findings are in conformity with previous studies that showed changes in the cholinergic system in BD (Sigitova et al. 2016). Cholinergic signaling is regulated by AChE, an enzyme that rapidly hydrolyses ACh (Sperling et al. 2008). ACh is involved in motor function, cognition, and attention, and an increase in AChE activity could reduce ACh levels, contributing to cholinergic signaling disruption in the brain. In fact, Cummings (2000) demonstrated that the reduction of ACh levels is associated with the manifestation of psychiatric diseases, particularly psychosis. In addition, the use of AChE inhibitors has been associated with a reduction of neuropsychiatric symptoms (Digby et al. 2012; Obermayer et al. 2017).

Blueberry extract was capable of preventing the alterations in AChE activity, similar to standard lithium drug treatment. Previous studies have shown that lithium improved memory and decreased AChE activity in the brain, and that these effects may be associated with the inhibition of GSK-3 β (Jing et al. 2012). Blueberry extract has also been described to improve memory and decrease AChE activity in experimental models (Papandreou et al. 2011). Thus, our findings provide additional mechanisms by which bioactive compounds in blueberry extract could have neuroprotective effects in BD.

Ketamine administration also induced an increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity in all evaluated brain structures. It has been established that dysfunction in Na⁺,K⁺-ATPase activity alters neuronal excitability leading to brain damage. Ketamine can activate glutamatergic neurotransmission by activating AMPA or kainate

receptors in dopaminergic neurons, increasing the release of dopamine in the synaptic cleft (Tan et al. 2012; Duan et al. 2013). Dopamine is involved in the regulation of several proteins, including the Na^+, K^+ -ATPase (Yang et al. 2007). Thus, the increase in Na^+, K^+ -ATPase activity could be explained, at least in part, by the activation of dopamine D2 receptors (Yamaguchi et al. 1996).

Interestingly, lithium treatment was able to prevent the change in Na^+, K^+ -ATPase activity only in the cerebral cortex. Corroborating our study, Cho (1995) also showed that lithium decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in rat brain synaptosomes. Similarly, blueberry extract also prevented the increase in Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex and striatum. Data from the literature have shown that anthocyanins are responsible for many beneficial properties of blueberries, such as their antioxidant (Debom et al. 2016; Oliveira et al. 2017) and anti-inflammatory (Smeriglio et al. 2016) activities. Neuroprotective actions of anthocyanins in experimental models, such as those for Alzheimer's disease (Gutierrez et al. 2014), Huntington disease (Kreilaus et al. 2016), and depression (Nabavi et al. 2017) have also been described. In addition, experimental evidence has suggested that cyanidin-3-*O*-glucoside protects cortical neurons against glutamate excitotoxicity (Bhuiyan et al. 2011). Of particular importance, extract rich in anthocyanins inhibited hippocampal cell death (Ahn et al. 2011) and reverted alterations in Na^+, K^+ -ATPase activity in the cortex cerebral and hippocampus in models of memory deficits (Gutierrez et al. 2014).

Ketamine administration increased ROS and TBARS levels and decreased the activity of the antioxidant enzymes, SOD and CAT, in the cerebral cortex and hippocampus. These findings are in accordance with other studies using this animal model of mania (Gazal et al. 2014; Debom et al. 2016). Zuo et al. (2007) also demonstrated that subanesthetic doses of ketamine led to the transient generation of hydroxyl radicals in mice. An increase in the TBARS level and alterations in antioxidant enzymes in the serum, plasma, and red blood cells has also been described in patients with BD (Machado-Vieira et al. 2007; Andreazza et al. 2008; Kapczinski and Quevedo 2016).

SOD is the enzyme responsible for converting the superoxide anion radical (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2), while CAT metabolizes H_2O_2 into water and molecular oxygen (Halliwell 2012). The decrease in activity of these antioxidant enzymes in the cerebral cortex and hippocampus may result in an accumulation of O_2^- and H_2O_2 radicals (Pisoschi and Pop 2015), which may be associated with an increase in ROS and TBARS levels, and a decrease in the total thiol content seen in this study. Overproduction of ROS and dysfunctions in antioxidant system can have deleterious effects on signal transduction and cell resilience, mainly by inducing lipid peroxidation in the membranes and damage to proteins (Valko et al. 2007). Thus, it is plausible to suggest that oxidative stress could also contribute to the alterations in AChE and Na^+, K^+ -ATPase activity seen in this study.

It is important to note that ketamine also induced an increase in the nitrite levels in the striatum. Nitrite is a metabolite of nitric oxide (NO), an important messenger involved with the regulation of mitochondrial function in the brain (Riobó et al. 2001). Yanik et al. (2004) showed an increase in the plasma nitrite levels in patients with BD. In addition, Venâncio et al. (2015) suggested that ketamine interferes with the activity of complex I, resulting in an increase in mitochondrial nitric oxide synthase (mitNOS) activity and elevated levels of NO. Furthermore, NO contributes to oxidative stress, because it can react with O_2^- and lead to the formation of peroxynitrite (ONOO^-), a powerful oxidant (Adam-Vizi 2005).

The antioxidant effect of blueberry extract may be associated with anthocyanins. It has already been shown that they can cross the blood-brain barrier (Andres-Lacueva et al. 2005) and act as a scavenger of free radicals (Del Bo et al. 2015). Among the main mechanisms involved in the antioxidant activity of anthocyanins is the ability to donate hydrogen atoms to free radicals, as well as the chelation of metallic ions (Han et al. 2015). In relation to antioxidant effects of lithium, evidence has suggested that this drug may increase the levels of the bcl-2 protein in the brain (Chen et al. 1999; Manji et al. 2000). Bcl-2 has been associated with mitochondrial activity, as well as with the antioxidant effects of lithium (Machado-Viera and Soares 2007).

In the present study, we also found that GST activity was increased in the cerebral cortex of the rats used in the mania model. In another study, Chan et al. (2008) demonstrated that the administration of ketamine also increased the activity of hepatic GST. Although we cannot state the exact mechanisms by which this increase occurred, a study in bipolar patients also demonstrated that the GST activity is enhanced (Andreazza et al. 2009), suggesting that the alteration in this enzyme's activity can be considered a compensatory mechanism.

In relation to our findings, an important aspect to be discussed is that when lithium or blueberry were administered separately, the preventive effects were similar. These data are in agreement with previous studies from our research group (Debom et al. 2016). Although lithium has a range of adverse effects, this drug is the standard pharmacological treatment of patients with BD (McKnight et al. 2012). Thus, the results obtained in this study suggest that the bioactive compounds in the blueberry extract could have the same therapeutic molecular targets as lithium.

Data from the literature have led to new perspectives on natural compounds, as well as the synergistic potential of numerous substances in the treatment of diseases (Hemaiswarya et al. 2008; Choi et al. 2012). The combination of selective therapy could enhance the beneficial effects, decrease doses compared to when the same drugs are administered individually, and reduce the side effects caused by drug monotherapy (Hemaiswarya et al. 2008). However, in our study, we found that the preventive effects in a model of mania was decreased when lithium and blueberry extract treatment were provided together. Considering that blueberry extract has many bioactive compounds with pharmacological effects, significant side effects and potential interactions with conventional drugs are possible.

Although we cannot precisely explain the mechanism involved in this interaction, it is important to consider that among the determinants for this difference in responses is the capacity for metal chelation, bioavailability, plasma concentrations, and a slow and continuous release of phenolic compounds from the gut into the bloodstream.

In conclusion, our findings demonstrate that blueberry extract prevents ketamine-induced alterations in AChE and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative stress in the brain in an experimental model of mania, suggesting that blueberry extract has lithium mimetic-properties. Blueberry extract is a natural and inexpensive therapeutic means to support a healthy brain in psychiatric disorders. However, more studies are necessary to evaluate the potential interactions with lithium and its use as an adjuvant therapy.

Legends of figures

Figure 1 - Animal model of mania induced by ketamine and prevention protocol with blueberry and/or lithium treatment.

Figure 2 - Effect of lithium (45 mg/kg, p.o.), blueberry extract (200 mg/kg, p.o.), and lithium (45 or 22.5 mg/kg, p.o.) plus blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) pretreatment on ketamine-induced hyperactivity in an open-field test in rats. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (#) Denotes $P < 0.05$ when compared with the vehicle/saline group. (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared with the vehicle/ketamine group (One-way ANOVA followed by Tukey test, $n = 7-10$).

Figure 3 - Effect of lithium (45 mg/kg, p.o.), blueberry extract (200 mg/kg, p.o.), and lithium (45 or 22.5 mg/kg, p.o.) plus blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) pretreatment on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum of animals in a ketamine-induced model of manic-like behavior. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (#) Denotes $P < 0.05$ when compared with the vehicle/saline group. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, and (***) $P < 0.001$ when compared with the vehicle/ketamine group (One-way ANOVA followed by Tukey test, $n = 7-10$).

Figure 4 - Effect of lithium (45 mg/kg, p.o.), blueberry extract (200 mg/kg, p.o.), and lithium (45 or 22.5 mg/kg, p.o.) plus blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) pretreatment on Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum of animals in a ketamine-induced model of manic-like behavior. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (#) Denotes $P < 0.05$ when compared with the vehicle/saline group. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, and (***) $P < 0.001$ when compared with the vehicle/ketamine group (One-way ANOVA followed by Tukey test, $n = 5-6$).

Figure 5 - Effect of lithium (45 mg/kg, p.o.), blueberry extract (200 mg/kg, p.o.), and lithium (45 or 22.5 mg/kg, p.o.) plus blueberry extract (200 mg/kg, p.o.) pretreatment on levels of ROS, nitrite, TBARS, total thiol content, and superoxide dismutase and catalase activity in the cerebral cortex of animals in a ketamine-induced model of manic-like behavior. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (#) Denotes $P < 0.05$ when compared with the vehicle/saline group. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, and (***) $P < 0.001$ when compared with the vehicle/ketamine group (One-way ANOVA followed by Tukey test, $n = 5-6$).

Figure 6 - Effect of lithium (45 mg/kg, p.o.), blueberry extract (200 mg/kg, p.o.), and lithium (45 or 22.5 mg/kg) plus blueberry extract (200 mg/kg) pretreatment on levels of ROS, nitrite, TBARS, total thiol content, and superoxide dismutase and catalase activity in the hippocampus of animals in a ketamine-induced model of manic-like behavior. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (#) Denotes $P < 0.05$ when compared with the vehicle/saline group. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, and (***) $P < 0.001$ when compared with the vehicle/ketamine group (One-way ANOVA followed by Tukey test, $n = 5-6$).

Figure 7 - Effect of lithium (45 mg/kg, p.o.), blueberry extract (200 mg/kg, p.o.), and lithium (45 or 22.5 mg/kg) plus blueberry extract (200 mg/kg) pretreatment on levels of ROS, nitrite, TBARS, total thiol content, and superoxide dismutase and catalase activity in the striatum of animals in a ketamine-induced model of manic-like behavior. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (#) Denotes $P < 0.05$ when compared with the vehicle/saline

group. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, and (***) $P < 0.001$ when compared with the vehicle/ketamine group (One-way ANOVA followed by Tukey test, $n=5-6$).

Figure 8 - Effect of lithium (45 mg/kg, p.o.), blueberry extract (200 mg/kg, p.o.), and lithium (45 or 22.5 mg/kg) plus blueberry extract (200 mg/kg) pretreatment on glutathione S-transferase activity in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum of animals in a ketamine-induced model of manic-like behavior. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (#) Denotes $P < 0.05$ when compared with the vehicle/saline group. (*) $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ when compared with the vehicle/ketamine group (One-way ANOVA followed by Tukey test, $n=5-6$).

References

- Adam-Vizi V (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7: 1140-1149. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1140>
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 27: 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.10.005>
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahn SH, Kim HJ, Jeong I, Hong YJ, Kim MJ, Rhie DJ, Jo YH, Hahn SJ, Yoon SH (2011) Grape seed proanthocyanidin extract inhibits glutamate-induced cell death through inhibition of calcium signals and nitric oxide formation in cultured rat hippocampal neurons. *BMC Neurosci* 12: 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-78>
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302: 141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- Ali SF, Lebel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13: 637–648.
- Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, Young LT, Yatham LN (2009) 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34: 263–271.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN (2008) Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. *J Affect Disord* 111: 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.04.013>
- Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA (2005) Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 8:111-120. <https://doi.org/10.1080/10284150500078117>
- Arnaiz G, Ordieres G (2014) Brain Na⁺,K⁺-ATPase activity in aging and disease. *Int J Biomed Sci* 10: 85-102.
- Bhuiyan MI, Kim HB, Kim SY, Cho KO (2011) The neuroprotective potential of cyanidin-3-glucoside fraction extracted from mulberry following oxygen-glucose deprivation. *Korean J Physiol Pharmacol* 15: 353–361. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2011.15.6.353>
- Bordignon CLJ, Francescato V, Nienow AA, Calvete E, Reginatto FH (2009) Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciênc Tecnol Aliment* 29: 183-188. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000100028>
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carvalho FB, Mello CF, Marisco PC, Tonello R, Girardi BA, Ferreira J, Oliveira MS, Rubin MA (2012) Spermidine decreases Na(+),K(+)-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *Eur J Pharmacol* 684: 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.046>
- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated activity. *Anal Biochem* 220: 375–380. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8)
- Chan WH, Su HC, Hung MH, Sun WZ, Fan SZ, Hsiao PN, Ueng TH (2008) Induction of hepatic glutathione S-transferase and UDP-glucuronosyltransferase activities by ketamine in rats. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 46: 2-7. [https://doi.org/10.1016/S1875-4597\(08\)60013-2](https://doi.org/10.1016/S1875-4597(08)60013-2)

Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Zhao ZH, Manji HK (1999) The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem* 72: 879-882. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.720879.x>

Cho YW (1995) Lithium-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca⁺-ATPase activities in rat brain synaptosome. *J Korean Med Sci* 10: 7-13. <https://doi.org/10.3346/jkms.1995.10.1.7>

Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ (2012) Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 87: 144-153. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.014>

Chowdhury MI, Hasan M, Islam MS, Sarwar MS, Amin MN, Uddin SMN, Rahaman MZ, Banik S, Hussain MS, Yokota K, Hasnat A (2017) Elevated serum MDA and depleted non-enzymatic antioxidants, macro-minerals and trace elements are associated with bipolar disorder. *J Trace Elem Med Biol* 39: 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.09.012>

Cummings JL (2000) Cholinesterase inhibitors: Expanding applications. *Lancet* 356: 2024-2025. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03393-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03393-6)

De Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canevar L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J, Zugno AI (2011) Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis* 26: 69-77. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9234-1>

Debom G, Gazal M, Soares MSP, Couto CAT, Mattos B, Lencina C, Kaster MP, Ghisleni GC, Tavares R, Braganhol E, Chaves VC, Reginatto FH, Stefanello F, Spanevello RM (2016) Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. *Brain Res Bull* 127: 260-269. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.10.008>

Del Bo C, Martini D, Porrini M, Klimis-Zacasc D, Riso P (2015) Berries and oxidative stress markers: an overview of human intervention studies. *Food Funct* 6: 2890-2917. <https://doi.org/10.1039/c5fo00657k>

Dickerson F, Stallings C, Vaughan C, Origoni A, Khushalani S, Yolken R (2012) Antibodies to the glutamate receptor in mania. *Bipolar Disord* 14: 547-553. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2012.01028.x>

Digby GJ, Noetzel MJ, Bubser M, Utley TJ, Walker AG, Byun NE, Lebois EP, Xiang Z, Sheffler DJ, Cho HP, Davis AA, Nemirovsky NE, Mennenga SE, Camp BW, Bimonte-Nelson HA, Bode J, Italiano K, Morrison R, Daniels JS, Niswender CM, Olive MF, Lindsley CW, Jones CK, Conn PJ (2012) Novel allosteric agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors induce brain region-specific responses that correspond with behavioral effects in animal models. *J Neurosci* 32: 8532-8544. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0337-12.2012>

Dobrota D, Matejovicova M, Kurella E, Boldyrev A (1999) Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell Mol Neurobiol* 19: 141-149.

Duan TT, Tan JW, Yuan Q, Cao J, Zhou QX, Xu L (2013) Acute ketamine induces hippocampal synaptic depression and spatial memory impairment through dopamine D1/D5 receptors. *Psychopharmacology* 228: 451-461. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3048-2>

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43: 37-71. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90015-9)

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407-421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)

Fornaro M, De Berardis D, Koshy AS, Perna G, Valchera A, Vancampfort D, Stubbs B (2016) Prevalence and clinical features associated with bipolar disorder polypharmacy: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat* 12: 719-735. <https://doi.org/10.2147/NDT.S100846>

Gazal M, Valente MR, Acosta BA, Kaufmann FN, Braganhol E, Lencina CL, Stefanello FM, Ghisleni G, Kaster MP (2014) Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *Eur J Pharmacol* 5: 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.12.028>

Ghedim FV, Fraga DB, Deroza PF, Oliveira MB, Valvassori SS, Steckert AV, Budni J, Dal-pizzol F, Quevedo J, Zugno AL (2012) Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *J Psychiatr Res* 46: 1569-1575. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.08.010>

Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, Rubin MA, Schmatz R, Silva CR, Cognato GP, Farias JG, Signor C, Morsch VM, Mazzanti CM, Bogo M, Bonan CD, Spanevello R (2014) Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci* 96: 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.014>

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.

Halliwell B (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 70: 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>

Han K, Kitano-Okada T, Seo J, Kim S, Saski K, Shimada K, Fukushima M (2015) Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins of adzuki bean extracts and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 14: 692-701. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.018>

Hemaiswarya S, Kruthiventi K, Doble M (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15: 639-652. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.008>

Jing P, Zhang JY, Ouyang Q, Wu J, Zhang XJ (2012) Lithium treatment induces proteasomal degradation of over-expressed acetylcholinesterase (AChE-S) and inhibit GSK3 β . *Chem Biol Interact* 203: 309-13. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.010>

Kapczinski F, Quevedo J (2016) Transtorno bipolar: teoria e clínica. *Artmed, Porto Alegre*

Kreilaus F, Spiro AS, Hannan AJ, Garner B, Jenner AM (2016) Therapeutic Effects of Anthocyanins and Environmental Enrichment in R6/1 Huntington's Disease Mice. *J Huntingtons Dis* 5: 285-296. <https://doi.org/10.3233/JHD-160204>

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27489>

Machado-Vieira R, Soares JC (2007) Transtornos de humor refratários a tratamento. *Rev Bras Psiquiatr* 29: 48-54. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462006005000058>

Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser VJr, Da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, Gentil V (2007) Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 421: 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.05.016>

Manji HK, Moore GJ, Chen G (2000) Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. *J Clin Psychiatry* 61: 82-96.

Mansur RB, Rizzo LB, Santos CM, Asevedo E, Cunha GR, Noto MN, Pedrini M, Zeni-Graiff M, Gouvea ES, Cordeiro Q, Reininghaus EZ, McIntyre RS, Brietzke E (2016) Bipolar disorder course, impaired glucose metabolism and antioxidant enzymes activities: A preliminary report. *J Psychiatr Res* 80: 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.05.014>

McKnight RF, Adida M, Budge K, Stockton S, Goodwin GM, Geddes JR (2012) Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379: 721-728. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61516-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61516-X)

Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175.

Moreno RA, Moreno DH, Ratzke R (2005) Diagnóstico, tratamento e prevenção da mania e da hipomania no transtorno bipolar. *Rev Psiquiatr Clin* 32: 39-48. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-60832005000700007>

Nabavi SM, Daglia M, Braidly N, Nabavi SF (2017) Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. *Nutr Neurosci* 20: 180-194. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1103461>

Nestler EJ, Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13: 1161-1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>

Obermayer J, Verhoog MB, Luchicchi A, Mansvelder HD (2017) Cholinergic Modulation of Cortical Microcircuits Is Layer-Specific: Evidence from Rodent, Monkey and Human Brain. *Front Neural Circuits* 11. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00100>

Oliveira PS, Chaves VC, Bona NP, Soares MSP, Cardoso JS, Vasconcellos FA, Tavares RG, Vizzotto M, Da Silva LMC, Grecco FB, Gamaro GD, Spanevello RM, Lencina CL, Reginatto FH, Stefanello FM (2017) Eugenia uniflora fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. *Biomed Pharmacother* 92: 935-941. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.131>

Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behav Brain Res* 219: 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.007>

Phillips ML, Kupfer DJ (2013) Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions. *Lancet* 381: 1663-1671. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60989-7)

Pisoschi A, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 97: 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Riobó NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ (2001) Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* 359: 139-145. <https://doi.org/10.1042/bj3590139>

Sagar R, Pattanayak RD (2017) Potential biomarkers for bipolar disorder: Where do we stand? *Indian J Med Res* 145: 7-16. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1386_16

Sigitova E, Fišar Z, Hroudová J, Cikánková T, Raboch J (2016) Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 71: 77-103. <https://doi.org/10.1111/pcn.12476>

Smeriglio A, Barreca D, Bellocchio E, Trombetta D (2016) Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytother Res* 30: 1265-1286. <https://doi.org/10.1002/ptr.5642>

Sperling LE, Steinert G, Boutter J, Landgraf D, Hescheler J, Pollet D, Layer PG (2008) Characterisation of cholinesterase expression during murine embryonic stem cell differentiation. *Chem Biol Interact* 175: 156-160. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.034>

Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-1555. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1543>

Tan S, Lam WP, Wai MSM, Yu WA, Yew DT (2012) Chronic Ketamine Administration Modulates Midbrain Dopamine System in Mice. *PLoS One* 7: 439-47. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043947>

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Venâncio C, Félix L, Almeida V, Coutinho J, Antunes L, Peixoto F, Summavielle T (2015) Acute ketamine impairs mitochondrial function and promotes superoxide dismutase activity in the rat brain. *Anesth Analg* 120: 320-328. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000539>

- Walker ER, McGee RE, Druss BG (2015) Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 72: 334-341. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.2502>
- Wang C, Sadovova N, Patterson TA, Zou X, Fu X, Hanig JP, Paule MG, Ali SF, Zhang X, Slikker JrW (2008) Protective effects of 7-nitroindazole on ketamine-induced neurotoxicity in rat forebrain culture. *Neurotoxicology* 29: 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.03.007>
- Wu Y, Zhou Q, Chen X, Li X, Wang Y, Zhang J (2017) Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and α -glucosidase inhibition effect. *Food Res Int* 100: 312-324. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.004>
- Yamaguchi I, Walk SF, Jose PA, Felder RA (1996) Dopamine D2L receptors stimulate Na⁺,K⁺-ATPase activity in murine LTK-cells. *Mol Pharmacol* 49: 373–378.
- Yang ZJ, Torbey M, Li X, Bernardy J, Golden WC, Martin LJ, Koehler RC (2007) Dopamine receptor modulation of hypoxic-ischemic neuronal injury in striatum of newborn piglets. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1339-1351. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600440>
- Yanik M, Vural H, Tutkun H, Zoroğlu SS, Savaş HA, Herken H, Koçyiğit A, Keleş H, Akyol O. (2004) The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 254: 43-47. <https://doi.org/10.1007/s00406-004-0453-x>
- Zugno AI, Valvassori SS, Scherer EBS, Mattos C, Matté C, Ferreira CL, Rezin GT, Wyse ATS, Quevedo J, Streck EL (2009) Na⁺,K⁺-ATPase activity in an animal model of mania. *J Neural Transm (Vienna)* 116: 431-436. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0198-9>
- Zuo DY, Wu YL, Yao WX, Cao Y, Wu CF, Tanaka M. (2007) Effect of MK-801 and ketamine on hydroxyl radical generation in the posterior cingulate and retrosplenial cortex of free-moving mice, as determined by in vivo microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* 86: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.05.010>

Table 1 - Anthocyanin identification of blueberry extract.

Anthocyanin	λ_{max} (nm)	Molecular formula	$[\text{M}]^+ m/z$ (Error - ppm)	Main fragments m/z
Delphinidin- <i>O</i> -galactoside	507	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{12}^+$	465.1060 (5.8)	303
Delphinidin- <i>O</i> -glucoside	507	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{12}^+$	465.1060 (5.8)	303
Cyanidin- <i>O</i> -galactoside	515	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^+$	449.1065 (-4.2)	287
Delphinidin- <i>O</i> -pentoside	505	$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_{11}^+$	435.0892 (3.0)	303
Cyanidin- <i>O</i> -glucoside	515	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^+$	449.1065 (-4.2)	287
Petunidin- <i>O</i> -galactoside	522	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{12}^+$	479.1161 (-6.1)	317
Petunidin- <i>O</i> -glucoside	522	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{12}^+$	479.1161 (1.1)	317
Cyanidin- <i>O</i> -pentoside	517	$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_{10}^+$	419.0931 (-4.7)	287
Peonidin- <i>O</i> -galactoside	517	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{11}^+$	463.1215 (-5.4)	301
Petunidin- <i>O</i> -pentoside	517	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^+$	449.1087 (-0.1)	317
Peonidin- <i>O</i> -glucoside	517	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{11}^+$	463.1215 (-5.4)	301
Malvidin- <i>O</i> -galactoside	530	$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}^+$	493.1326 (-4.1)	331
Malvidin- <i>O</i> -glucoside	530	$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}^+$	493.1326 (-4.1)	331
Peonidin- <i>O</i> -pentoside	515	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}^+$	433.1101 (-7.9)	301
Malvidin- <i>O</i> -pentoside	522	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{11}^+$	463.1207 (-7.1)	331

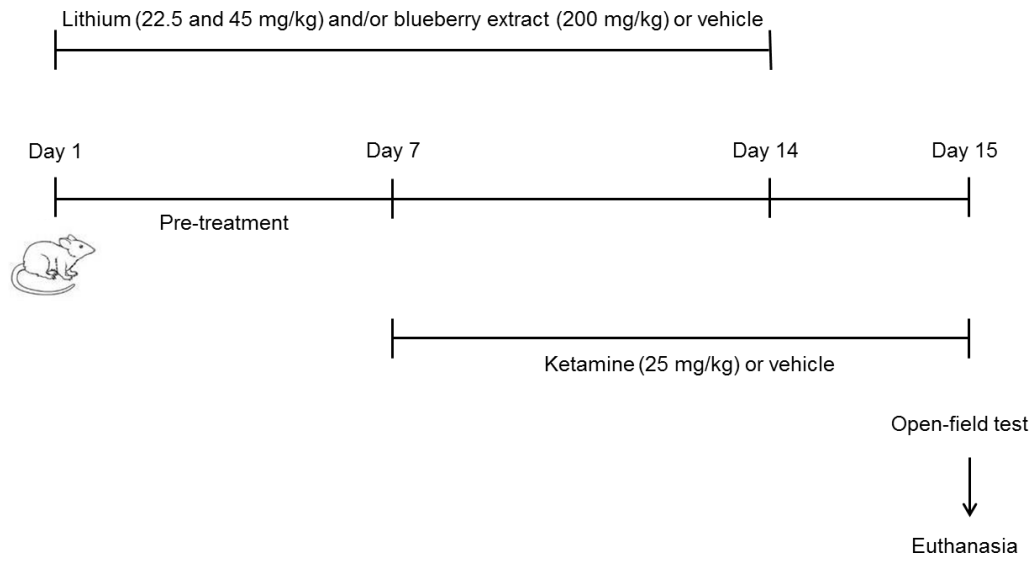


Figure 1

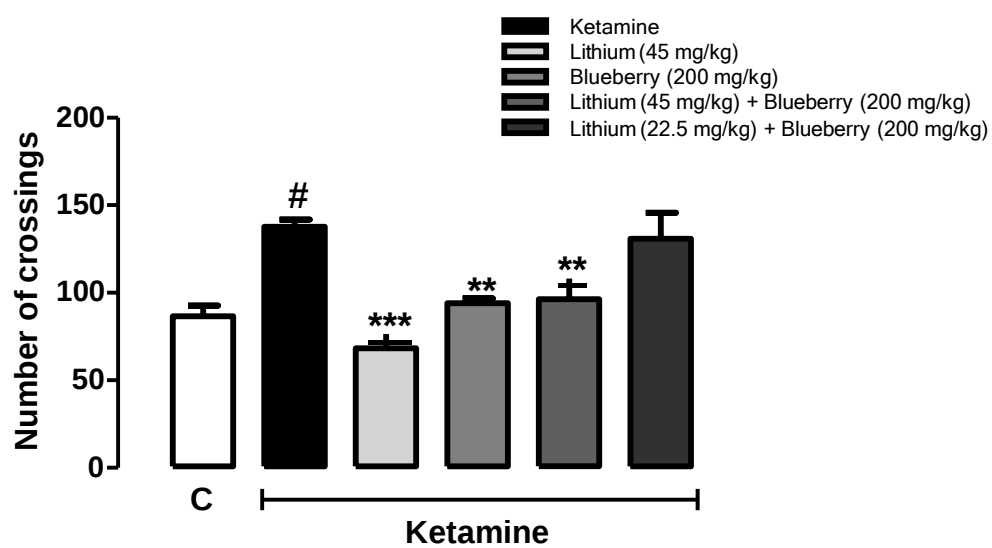


Figure 2

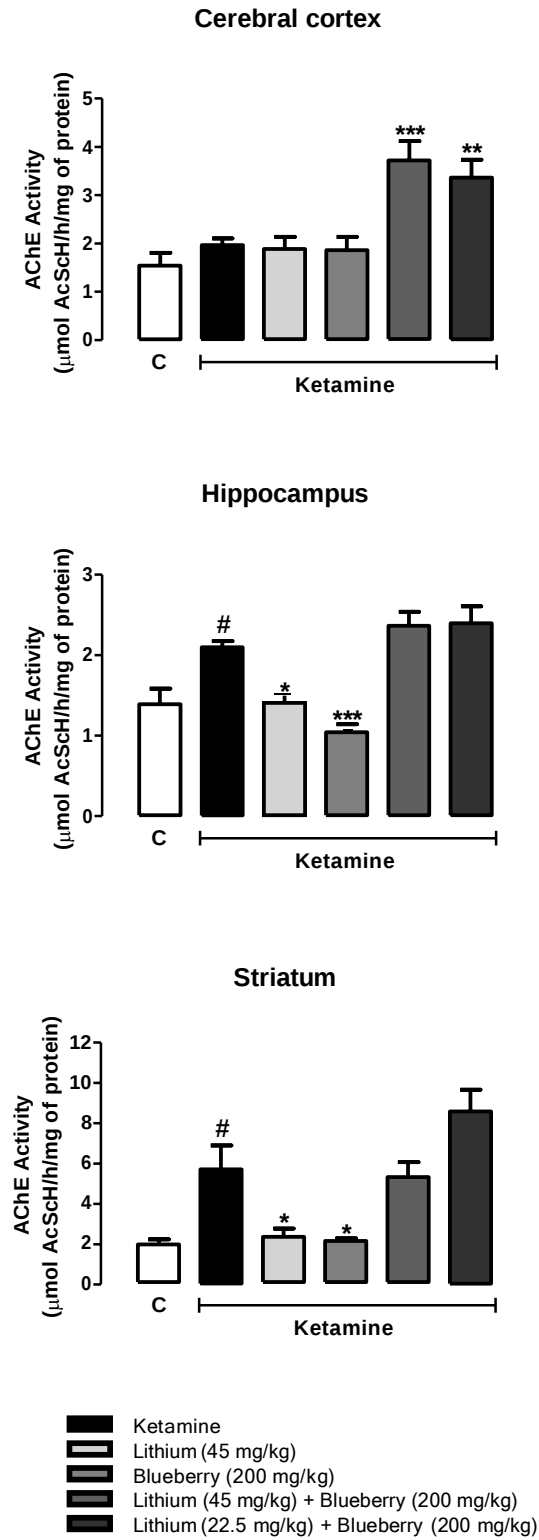


Figure 3

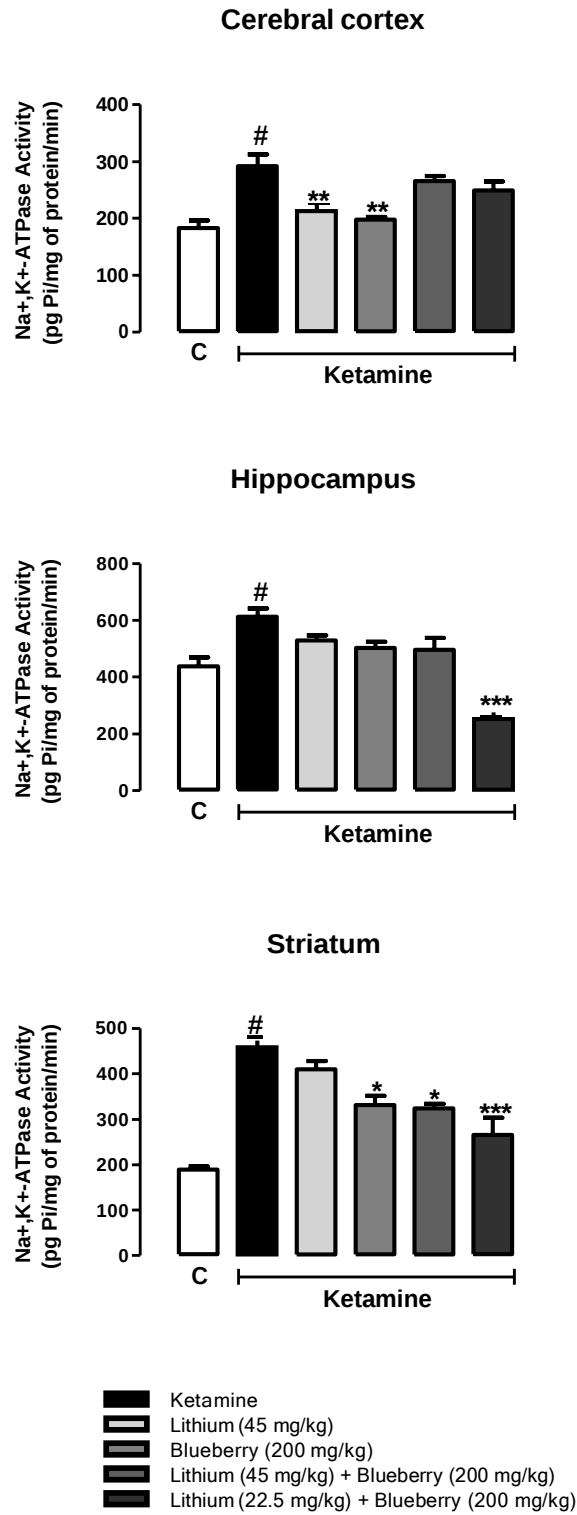


Figure 4

Cerebral cortex

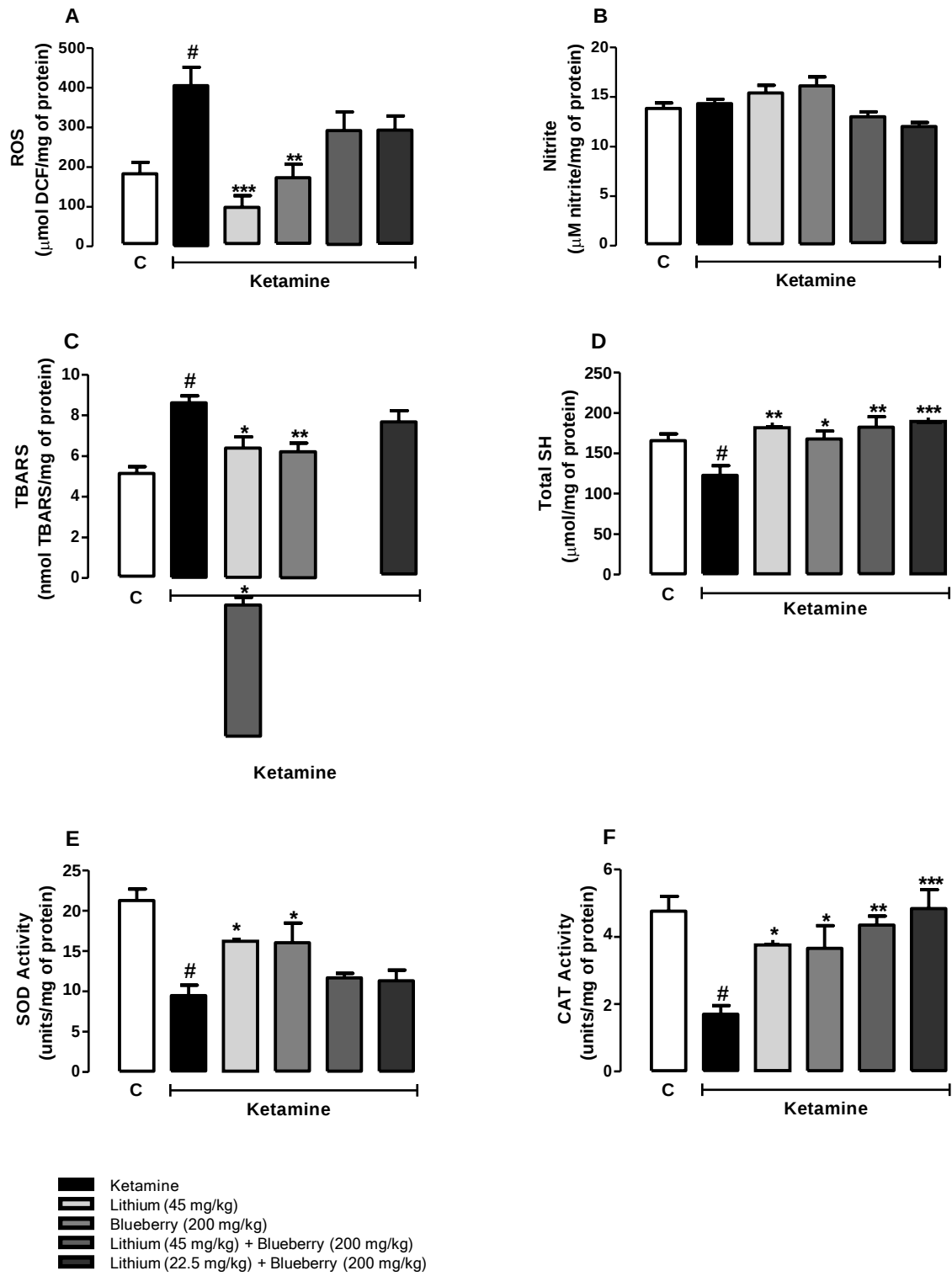


Figure 5

Hippocampus

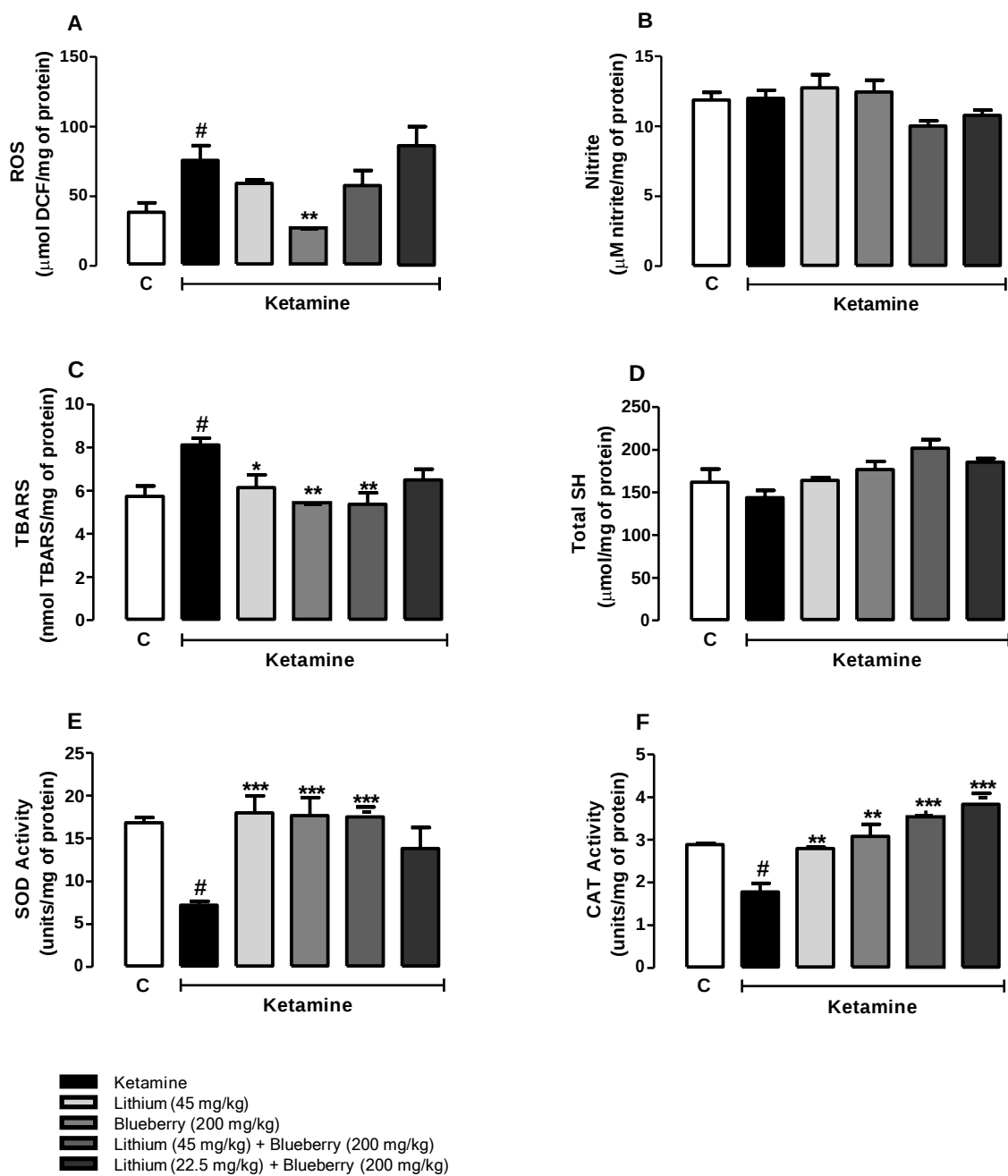


Figure 6

Striatum

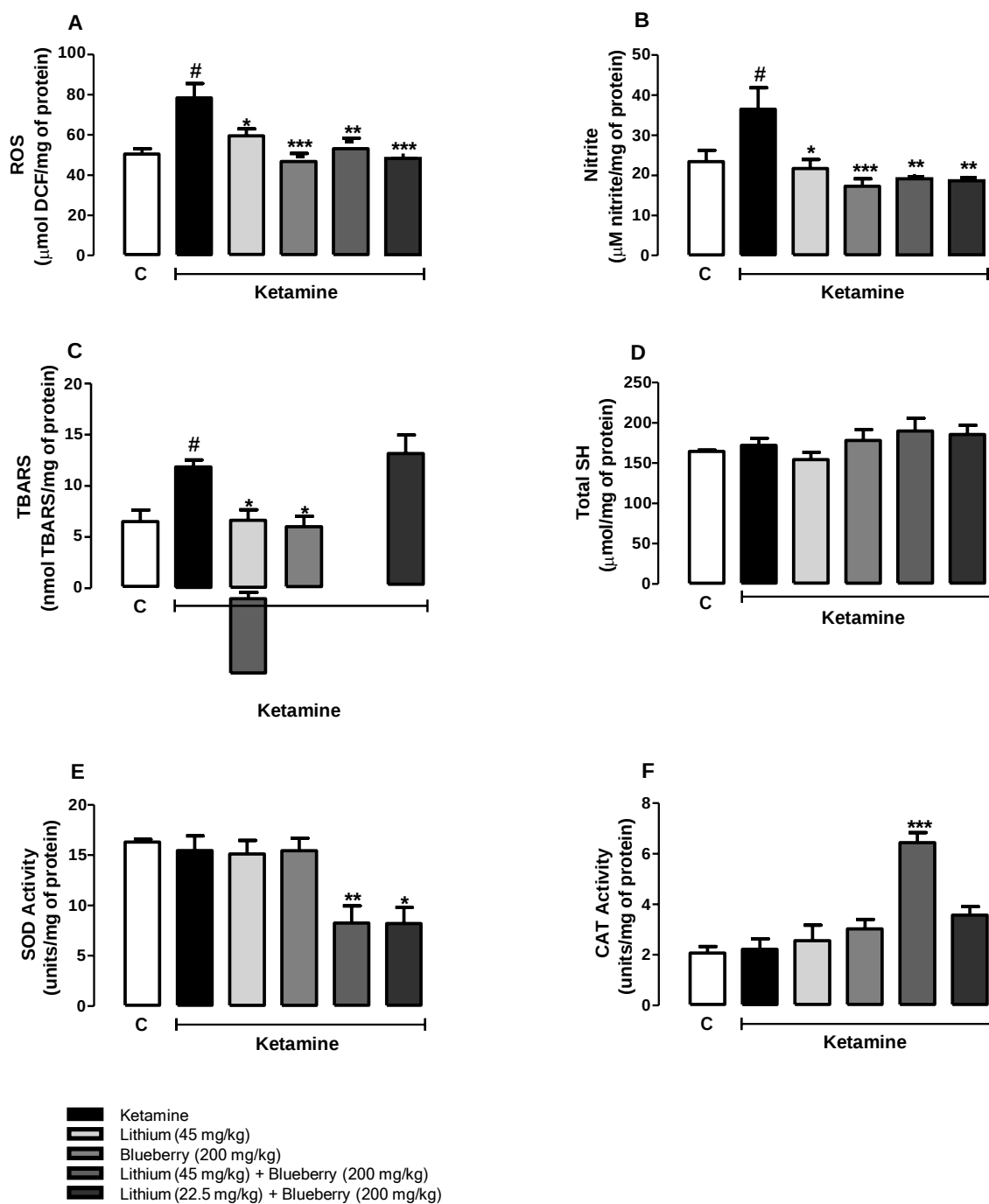


Figure 7

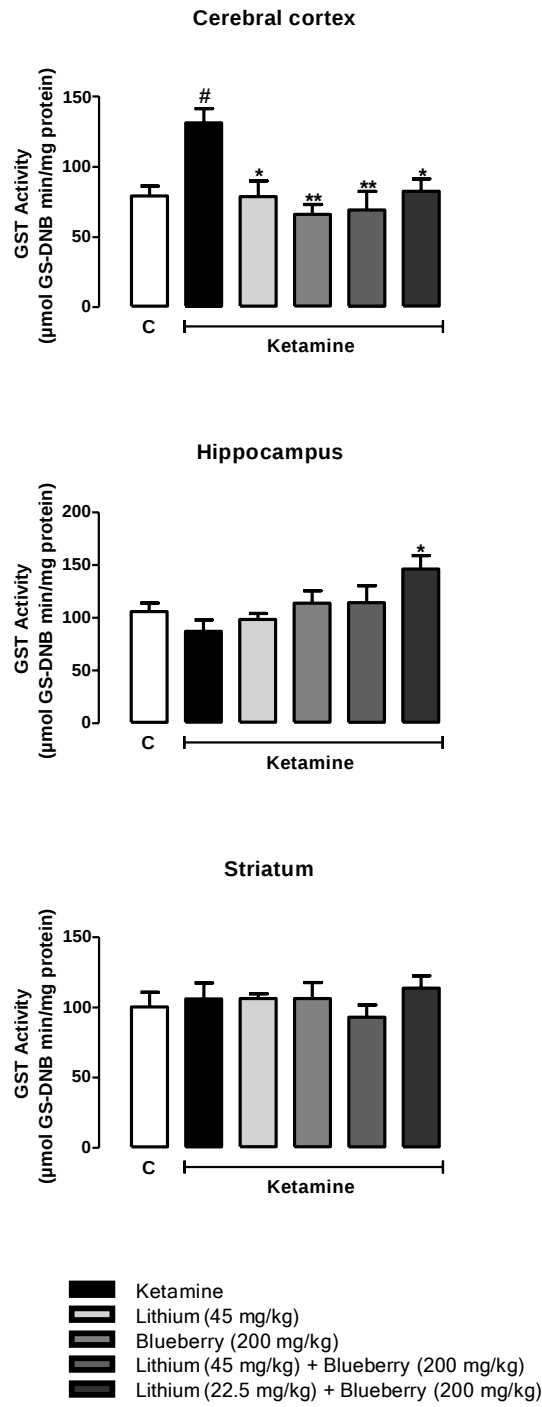


Figure 8

5 Conclusões

O modelo animal de mania induzido pela cetamina foi capaz de preencher os três critérios importantes para ser considerado um bom modelo experimental. A administração de cetamina alterou o comportamento locomotor dos animais (validade de face), bem como parâmetros de estresse oxidativo e atividade de enzimas (validade de constructo) e, ainda, as alterações induzidas por ela foram prevenidas pelo fármaco padrão usado na clínica (validade preditiva).

De forma geral, nosso estudo demonstrou que o extrato de mirtilo, de forma semelhante ao lítio, foi capaz de prevenir a hiperlocomoção, bem como os parâmetros neuroquímicos induzidos pela cetamina. Entretanto, observa-se que o efeito preventivo no modelo animal de mania foi diminuído quando o extrato de mirtilo foi associado com o lítio em diferentes doses.

Os efeitos neuroprotetores do extrato de mirtilo podem estar associados com a presença das antocianinas em sua composição, uma vez que esse flavonoide já demonstrou os seus efeitos protetores frente a diversas patologias. Considerando a potencialidade do mirtilo na prevenção das alterações do modelo experimental de mania, pode-se concluir que mais estudos são necessários para avaliar seus efeitos como um adjuvante do lítio no tratamento dos episódios maníacos.

Os resultados demonstrados neste trabalho podem colaborar na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos associados a esse transtorno de humor, bem como na busca de compostos com ação protetora visando a melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

Referências

_____. Portaria nº 18, 30 de abril, 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 1999a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

_____. Portaria nº 398, 30 de abril, 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 1999b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

ALDA, M. Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 661-670, 2015.

American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)**. 5. ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2017.

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. 2-3, p. 135-144, 2008.

ANDREAZZA, A. C.; SHAO, L.; WANG, J. F.; YOUNG, L. T. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. **Archives General Psychiatry**, p. 360-368, 2010.

ANGELOVA, P. R.; ABRAMOV, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letters**, 2018.

APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 1, p. 44-52, 2007.

BAE, Y. S.; OH, H.; RHEE, S. G.; YOO, Y. D. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. **Molecules and Cells**, v. 32, n. 6, p. 491-509, 2011.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; de PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASU, A.; SCHELL, J.; SCOFIELD, R. H. Dietary fruits and arthritis. **Food and Function**, 2017.

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.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G. S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 804-817, 2011.

BEYER, D. K. E.; FREUND, N. Animal models for bipolar disorder: from bedside to the cage. **International Journal of Bipolar Disorders**, v. 5, n. 35, 2017.
BRATLIEN, U.; OIE, M.; HAUG, E.; MOLLER, P.; ANDREASSEN, O. A.; LIEN, L.; MELLE, I. Environmental factors during adolescence associated with later development of psychotic disorders - a nested case-control study. **Psychiatry Research**, v. 215, n. 3, p. 579-585, 2014.

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J. E. Mechanism of structural transformations of anthocyanins in acidic media. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 1359-1364, 1977.

CASTRO, C. C.; PAGNUSSAT, A. S.; MOURA, N.; CUNHA, M. J.; MACHADO, F. R.; WYSE, A. T. S.; NETTO, C. A. Coumestrol treatment prevents Na⁺,K⁺-ATPase inhibition and affords histological neuroprotection to male rats receiving cerebral global ischemia. **Neurological Research**, v. 36, n. 3, p. 198-206, 2014.

COYLE, J. T.; DUMAN, R. S. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. **Neuron**, v. 38, n. 2, p. 157-160, 2003.

CUMMINGS, J. L. Cholinesterase inhibitors: a new class of psychotropic compounds. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 1, p. 4-15, 2000.

DEBOM, G.; GAZAL, M.; SOARES, M. S. P.; COUTO, C. A. T.; MATTOS, B.; LENCINA, C.; KASTER, M. P.; GHISLENI, G. C.; TAVARES, R.; BRAGANHOL, E.; CHAVES, V. C.; REGINATTO, F. H.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R. M. Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. **Brain Research Bulletin**, v. 127, p. 260-269, 2016.

DICKERSON, F.; STALLINGS, C.; VAUGHAN, C.; ORIGONI, A.; KHUSHALANI, S.; YOLKEN, R. Antibodies to the glutamate receptor in mania. **Bipolar Disorders**, v. 14, n. 5, p. 547-553, 2012.

DIGBY, G. J.; NOETZEL, M. J.; BUBSER, M.; UTLEY, T. J.; WALKER, A. G.; BYUN, N. E.; LEBOIS, E. P.; XIANG, Z.; SHEFFLER, D. J.; CHO, H. P.; DAVIS, A. A.; NEMIROVSKY, N. E.; MENNENGA, S. E.; CAMP, B. W.; BIMONTE-NELSON, H. A.; BODE, J.; ITALIANO, K.; MORRISON, R.; DANIELS, J. S.; NISWENDER, C. M.; OLIVE, M. F.; LINDSLEY, C. W.; JONES, C. K.; CONN, P. J. Novel allosteric agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors induce brain region-specific responses that correspond with behavioral effects in animal models. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 25, p. 8532-8544, 2012.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Ions and energy in mammalian brain. **Progress Neurobiology**, v. 43, n. 1, p. 37-71, 1994.

ETAIN, B.; AAS, M.; ANDREASSEN, O. A.; LORENTZEN, S.; DIESET, I.; GARD, S.; KAHN, J. P.; BELLIVIER, F.; LEBOYER, M.; MELLE, I.; HENRY, C. Childhood trauma is associated with severe clinical characteristics of bipolar disorders. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 991-998, 2013.

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

FERNANDES, I.; FARIA, A.; CALHAU, C.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 54-66, 2014.

FERREIRA-VIEIRA, T. H.; GUIMARÃES, I. M.; SILVA, F. R.; RIBEIRO, F. M. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 101-115, 2016.

FORNARO, M.; DE BERARDIS, D.; KOSHY, A. S.; PERNA, G.; VALCHERA, A.; VANCAMPFORT, D.; STUBBS, B. Prevalence and clinical features associated with bipolar disorder polypharmacy: a systematic review. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p. 719-735, 2016.

FREY, B. N.; VALVASSORI, S. S.; REUS, 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 Psychiatry & Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 326-332, 2006.

GAMARO, G. D.; STRECK, E. L.; MATTÉ, C.; PREDIGER, M. E.; WYSE, A. T. S.; DALMAZ, C. Reduction of hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 9, p. 1339-1344, 2003.

GAZAL, M.; KAUFMANN, F. N.; ACOSTA, B. A.; OLIVEIRA, P. S.; VALENTE, M. R.; ORTMANN, C. F.; STURBELLE, R.; LENCINA, C. L.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; REGINATTO, F. H.; GHISLENI, G. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical research**, v. 40, n. 7, p. 1421-1430, 2015.

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. 5, p. 132-139, 2014.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GERGERLIOGLU, H. S.; SAVAS, H. A.; BULBUL, F.; SELEK, S.; UZ, E.; YUMRU, M. Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 697-702, 2007.

GHEDIM, F. V.; FRAGA, D. de B.; DEROZA, P. F.; OLIVEIRA, M. B.; VALVASSORI, S. S.; STECKERT, A. V.; BUDNI, J. DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; ZUGNO, A. L. 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. 12, p. 1569-1575, 2012.

GLYNN, I. M. All hands on the sodium pump. **The Journal of Physiology**, v. 462, p. 1-30. 1993.

GRANDE, I.; BERK, M.; BIRMAHER, B.; VIETA, E. Bipolar disorder. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1561-1572, 2016.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B., Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. **Biomedical Journal**, v. 37, p. 99-105, 2014.

HALLIWELL, B., Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. 257-265, 2012.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-255, 2004.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010.

HIRSCHFELD, R. M. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, n. 1, p. 12-16, 2014.

HOFFMANN, A. Mirtilo: Aspectos gerais da cultura. **Embrapa Uva e Vinho**, 2014.

JOPE, R. S.; WRIGHT, S. M.; WALTER-RYAN, W. G.; ALARCON, R. D. Effects of bipolar affective disorder and lithium administration on the cholinergic system in human blood. **Journal of Psychiatric Research**, v. 20, n. 1, p. 9-18, 1986.

KALT, W.; BLUMBERG, J. B.; MCDONALD, J. E.; VINQVIST-TYMCHUK, M. R.; FILLMORE, S. A. E.; GRAF, B. A.; O'LEARY J. M.; MILBURY, P. E. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 705-712, 2008.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. (Org.). **Transtorno bipolar: teoria e clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 511- 535, 2002.

KATALINIC, N.; LAI, R.; SOMOGYI, A.; MITCHELL, P. B.; GLUE, P.; LOO, C. K. Ketamine as a new treatment for depression: a review of its efficacy and adverse effects. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 47, n. 8, p. 710-727, 2013.

KATO, T.; KATO, N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 2, p. 180-190, 2000.

KUPFER, D. J. The increasing medical burden in bipolar disorder. **Journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 20, p. 2528-30, 2005.

LAZARY, V. M. D. Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama. [Monografia]. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM, Brasília, 2010.

LOGAN, R. W.; MCCLUNG, C. A. Animal models of bipolar mania: the past, present and future. **Neuroscience**, v. 3, p. 163-188, 2016.

LOWE, F. Biomarkers of oxidative stress. **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**, ed. I. Laher, Springer, Berlin, Heidelberg, 1st edn, 2014, vol. 2, ch. 3, pp. 65-87, 2014.

MACHADO-VIEIRA, R. Lithium, Stress, and Resilience in Bipolar Disorder: Deciphering this key homeostatic synaptic plasticity regulator. **Journal of Affective Disorders**, 2017.

MACHADO-VIEIRA, R.; ANDREAZZA, A. C.; VIALE, C. I.; ZANATTO, V.; CERESER, V. JR.; da SILVA, V. 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.

MARASHLY, E. T.; BOHLEGA, S. A. Riboflavin Has Neuroprotective Potential: Focus on Parkinson's Disease and Migraine. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. 333, p. 1-12, 2017.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARTÍN, J.; DÍAZ-MONTAÑA, E. J.; ASUERO, A. G. Recovery of anthocyanins using membrane technologies: a review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 143-175, 2017.

MATTERA, R.; BENVENUTO, M.; GIGANTI, M. G.; TRESOLDI, I.; PLUCHINOTTA, F. R.; BERGANTE, S.; TETTAMANTI, G.; MASUELLI, L.; MANZARI, V.; MODESTI, A.; BEI, R. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 2017.

MAZZA, G. Anthocyanins and heart health. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 369-374, 2007.

MCKNIGHT, R. F.; ADIDA, M.; BUDGE, K.; STOCKTON, S.; GOODWIN, G. M.; GEDDES, J. R. Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 379, n. 9817, p. 721-728, 2012.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. *Ação antioxidante* de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim do SBCTA**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; RATZKE, R. Diagnóstico, tratamento e prevenção da mania e da hipomania no transtorno bipolar. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 39-48, 2005.

NOVICK, D. M.; SWARTZ, H. A.; FRANK, E. Suicide attempts in bipolar I and bipolar II disorder: a review and meta-analysis of the evidence. **Bipolar Disorders**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2010.

OBERMAYER, J.; VERHOOG, M. B.; LUCHICCHI, A.; MANSVELDER, H. D. Cholinergic Modulation of Cortical Microcircuits Is Layer-Specific: Evidence from Rodent, Monkey and Human Brain. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 11, 2017.

PATEL, S. S.; RAGHUWANSHI, R.; MASOOD, M.; ACHARYA, A.; JAIN, S. K. Medicinal plants with acetylcholinesterase inhibitory activity. **Reviews in the Neuroscience**, 2018.

POHANKA, M. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Is a Target in Pharmacology and Toxicology. International. **Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 2219-2238, 2012.

PRIOR, R. L.; WU, X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. **Free Radical Research**, v. 40, n. 10, p. 1014-1028, 2006.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

RAO, J. S.; KELLOM, M.; REESE, E. A.; RAPOPORT, S. I.; KIM, H. W. Dysregulated glutamate and dopamine transporters in postmortem frontal cortex from bipolar and schizophrenic patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 136, n. 1-2, p. 63-71, 2012.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. ISBN: 85-212-0326-8.

RICKE, A. K.; SNOOK, R. J.; ANAND, A. Induction of prolonged mania during ketamine therapy for reflex sympathetic dystrophy. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 13-14, 2011.

ROBERTS, C. H.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome, **Life Science**, v. 84, p. 705-712, 2009.

SAUNDERS, K. E.; GEDDES, J. R. The Management of Bipolar Disorder. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 77, n. 3, p. 175-179, 2016.

SEVERANCE, E. G.; GRESSITT, K. L.; YANG, S.; STALLINGS, C. R.; ORIGONI, A. E.; VAUGHAN, C.; KHUSHALANI, S.; ALAEDINI, A.; DICKERSON, F. B.; YOLKEN, R. H. Seroreactive marker for inflammatory bowel disease and associations with antibodies to dietary proteins in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 16, n. 3, p. 230-240, 2014.

SHARMA, A. N.; FRIES, G. R.; GALVEZ, J. F.; VALVASSORI, S. S.; SOARES, J. C.; CARVALHO, A. F.; QUEVEDO, J. Modeling mania in preclinical settings: a comprehensive review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 66, p. 22-34, 2016.

SIES, H. **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**. New York: Academic Press, 1991.

SIGITOVA, E.; FIŠAR, Z.; HROUDOVÁ, J.; CIKÁNKOVÁ, T.; RABOCH, J. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. **Psichyatriy and Clinical Neurosciences**, v. 71, n. 2, p. 77-103, 2016.

SILVA, L. R.; MARTINS, L. V.; CALOU, F. B.; CALOU, I. B. F.; DEUS, M. M.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SINELLI, N.; SPINARDI, A.; DI EGIDIO, V.; MIGNANI, I.; CASIRAGHI, E. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 31-36, 2008.

SONG, J.; BERGEN, S. E.; KUJA-HALKOLA, R.; LARSSON, H.; LANDÉN, M.; LICHTENSTEIN, P. Bipolar disorder and its relation to major psychiatric disorders: a family-based study in the Swedish population. **Bipolar Disorders**, v. 17, n. 2, p. 184-193, 2015.

SOREQ, H.; SEIDMAN S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SOUZA, L. C.; WILHELM, E. A.; BORTOLATTO, C. F.; NOGUEIRA, C. W.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. The protective effect of melatonin against brain oxidative stress and hyperlocomotion in a rat model of mania induced by ouabain. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 316-324, 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.

TANG, V.; WANG J. F. Oxidative Stress in Bipolar Disorder. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, p. 1-8, 2012.

TER-MINASSIAN, A. Cerebral metabolism, brain injury. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, v. 7, p. 714-721, 2006.

TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 1, p. 159-170, 2012.

VENANCIO, C.; FELIX, L.; ALMEIDA, V.; COUTINHO, J.; ANTUNES, L.; PEIXOTO, F.; SUMMAVIELLE, T. Acute ketamine impairs mitochondrial function and promotes superoxide dismutase activity in the rat brain. **Anesthesia and Analgesia**, v. 120, p.320-328, 2015.

WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1759-1768, 2012.

WILLIAMSON, G. The role of polyphenols in modern nutrition. **Nutrition Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 226-235, 2017.

WOOLF, N. J.; BUTCHER, L. L. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. **Behavioral Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 488-498, 2011.

YATHAM, L. N.; KENNEDY, S. H.; PARIKH, S. V.; SCHAFFER, A.; BEAULIEU, S.; ALDA, M.; O'DONOVAN, C.; MACQUEEN, G.; MCINTYRE, R. S.; SHARMA, V.; RAVINDRAN, A.; YOUNG, L. T.; MILEV, R.; BOND, D. J.; FREY, B. N.; GOLDSTEIN, B. I.; LAFER, B.; BIRMAHER B.; HÁ, K.; NOLEN, W. A.; BERK, M. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) Collaborative Update of Canmat Guidelines for the Management of Patients with Bipolar Disorder: Update 2013, **Bipolar Disorder**, v. 15, n. 1, p. 1-44, 2013.

ZUGNO, A. I.; VALVASSORI, S. S.; SCHERER, E. B. S.; MATTOS, C.; MATTÉ, C.; FERREIRA, C. L.; REZIN, G. T.; WYSE, A. T. S.; QUEVEDO, J.; STRECK, E. L. Na⁺,K⁺-ATPase activity in an animal model of mania. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 4, p. 431-436, 2009.

ANEXOS

Anexo A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA)



Pelotas, 28 de novembro de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta de ensino/extensão intitulada **“Avaliação do potencial terapêutico do mirtilo em parâmetros comportamentais e bioquímicos em modelo experimental de mania”**, registrada com o nº 23110.009085/2016-15, sob a responsabilidade de **Rosélia Maria Spanevello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 21/11/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	10/01/2017 a 10/01/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	160
Idade	50-60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPEL

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

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9085-2016).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
 Presidente da CEEA


 Assinatura da Professora Responsável

Ciente em: 08/03/2017