

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Alencar Kolinski Machado

**PROPRIEDADES NEUROFARMACOLÓGICAS DA *Euterpe oleracea*:  
ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL USO NO TRATAMENTO DE  
DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS**

Santa Maria, RS  
2017



**Alencar Kolinski Machado**

**PROPRIEDADES NEUROFARMACOLÓGICAS DA *Euterpe oleracea*: ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Área de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Machado, Alencar Kolinski

Propriedades neurofarmacológicas da Euterpe oleracea: estudo in vitro do potencial uso no tratamento de doenças psiquiátricas / Alencar Kolinski Machado.- 2017.

159 p.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2017

1. Euterpe oleracea Mart 2. Açai 3. Transtorno bipolar  
4. Disfunção mitocondrial 5. Inflamação crônica I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da II. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Alencar Kolinski Machado. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: alencarkolinski@gmail.com


Alencar Kolinski Machado

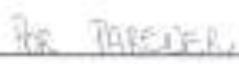
**PROPRIEDADES NEUROFARMACOLÓGICAS DA *Euterpe oleracea*: ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Área de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovado em 26 de janeiro de 2017:

  
Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)  
(Presidente Orientadora)

  
Michele Korato Sagrillo, Dra. (UNIFRA)

  
Mirian Salvador, Dra. (UCS)

  
Maria Amália Passinato, Dra. (UFSM)

  
Roberto Crist Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil

2017



## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese de doutorado à minha família, ao meu pai, mãe e irmã, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, dando suporte, amor e confiança para que eu chegasse até a conclusão desta etapa.*





## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por estar sempre me guiando pelo melhor caminho, pelas oportunidades, conquistas e aprendizados e por me presentear com o privilégio de possuir pessoas tão especiais em minha vida.

Aos meus queridos pais João Claudio e Ana Lúcia, por estarem ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e aconselhando, sem medir esforços para que eu realizasse meus sonhos. Falo e repito, meus pais são sinônimo de amor! Obrigado pela amizade, carinho e companheirismo de todas as horas, me sinto privilegiado por tê-los como meus pais.

À minha querida irmã Amanda que ilumina nossas vidas todos os dias. Obrigado pelo amor e carinho e por sempre torcer por mim. Mana querida, eu serei eternamente grato por sempre estar a minha espera nos fins de semana para me dar aquele abraço apertado e por ser essa pessoa tão especial e amável que és.

À professora Dr<sup>a</sup> Ivana pelas oportunidades e confiança. Tudo começou com uma banca durante a graduação e aqui estamos. Agradeço pelos ensinamentos, tanto profissionais como pessoais, pelo empenho, trabalho e dedicação, que nem mesmo em situações não tão favoráveis deixaram de acontecer. Terás sempre minha admiração, amizade e respeito.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana pelas oportunidades e comprometimento. Obrigado por ter me acolhido em seu laboratório em Toronto, essa sem dúvidas foi uma das maiores oportunidades profissionais que já tive. Agradeço pelas orientações, atenção e dedicação.

Agradeço *in memoriam*, aos meus avós Alivino e Jacyra, pois devo também a eles os meus estudos. Dignos de admiração para sempre, exemplos de dedicação, compaixão e amor. Pessoas especiais que sempre nos ensinaram o que realmente possui valor na vida, sem vocês eu não seria o que sou hoje.

Aos meus avós João e Eloisa pelo carinho e por sempre torcerem pelo meu crescimento pessoal e profissional. Aos tios (as), primos (as), padrinhos e madrinhas que sempre estiveram ao meu lado.

A minha amiga de todas as horas Vanessa, que apesar de algumas vezes não nos vermos, sei que está sempre presente em pensamentos positivos. Torço muito por ti e sei que irás muito longe, pois tens muito potencial.

A minha colega e amiga Francine por ter sempre me ajudado nos experimentos, estudos, estatísticas e pela amizade de todos os dias que renderam muitas risadas e momentos bons. Pode contar sempre comigo.

Aos meus eternos amigos Tatiane e Alexandre por terem sempre me apoiado e ajudado no período em que morei no Canadá. Nunca esquecerei o quão importantes vocês foram para a realização do meu doutorado sanduíche no exterior. Tenho certeza que manteremos tamanha amizade e fidelidade para sempre. Agradeço também à Raíssa e ao Eduardo, os quais são amigos que também o Canadá me presenteou e que levarei sempre no meu coração.

Aos amigos e colegas de apartamento Danieli e Charles. Obrigado pelo companheirismo, atenção e paciência. Os aprecio pelas pessoas que são e espero que o tempo ainda nos brinde com muitos momentos positivos juntos.

As colegas e amigas, Verônica e Fernanda pelas ajudas e pela estimada amizade. Esses anos de convívio nos deixaram muitas histórias a contar. Vocês são pessoas muito queridas e estarei sempre pronto a ajudá-las quando preciso.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Biogenômica que são exemplos de coleguismo. Desde que entrei no laboratório me senti em casa, admiro cada um pelas suas características e qualidades. O meu muito obrigado de coração.

À Universidade Federal de Santa Maria pela excelente estrutura e qualidade na formação de profissionais. Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, especialmente à coordenação, professores e a secretária Zeli, que sem dúvidas desempenham suas atribuições de forma ética e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos de doutorado no Brasil e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida de doutorado sanduíche no exterior e pelos recursos financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

***“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”***

*(Eleanor Roosevelt)*



## RESUMO

### **PROPRIEDADES NEUROFARMACOLÓGICAS DA *Euterpe oleracea*: ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS**

AUTOR: Alencar Kolinski Machado  
ORIENTADOR(A): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introdução:** As doenças neuropsiquiátricas, como o transtorno bipolar, possuem fisiopatologia bastante complexa. Muitas vezes o diagnóstico e a escolha de um tratamento eficaz são de difícil realização. Atualmente vêm sendo desenvolvidos estudos relacionados aos mecanismos causais e que podem ser direcionados a descoberta de novos biomarcadores característicos de doenças mentais. Alguns estudos descrevem a existência de uma forte associação entre doenças neuropsiquiátricas e disfunção mitocondrial e consequentes alterações celulares. Adicionalmente, algumas doenças psiquiátricas estão também associadas à inflamação crônica, via produção de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a busca pelo desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças psiquiátricas é de grande necessidade. A *Euterpe oleracea*, espécie conhecida popularmente como açaí, é uma fruta amazônica potencial candidata a estudos neurofarmacológicos devido a sua constituição química que inclui uma variedade de moléculas bioativas que poderiam atuar tanto melhorando a função mitocondrial e a resposta inflamatória. **Objetivo:** realizar revisão da literatura sobre o impacto da disfunção mitocondrial no transtorno bipolar, caracterizar quimicamente e avaliar o potencial efeito neurofarmacológico *in vitro* do extrato de açaí na modulação da função mitocondrial, do metabolismo oxidativo e inflamatório. **Metodologia:** inicialmente foi produzido um estudo de revisão teórico-literário sobre a associação entre o transtorno bipolar e o metabolismo mitocondrial celular baseado em artigos científicos publicados nos últimos 20 anos em revistas indexadas no PUBMED-MEDLINE da Biblioteca dos Estados Unidos da América. Esta revisão auxiliou na concepção do delineamento da parte experimental do trabalho. A pesquisa experimental *in vitro* foi feita utilizando-se a linhagem comercial SH-SY5Y expostas a rotenona. As células SH-SY5Y foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC<sup>®</sup>) e foram tratadas com um extrato hidroalcolico de açaí liofilizado, no qual as principais substâncias bioativas foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O efeito do açaí sobre a viabilidade celular foi avaliado através de diferentes curvas concentração-efeito. Foi induzida disfunção no complexo I mitocondrial através do uso da rotenona nas concentrações de 5, 15 e 30 nM. Antes ou após o tratamento com rotenona, foi adicionado o extrato de açaí (5 µg/mL) a fim de avaliar a capacidade de prevenção e/ou reversão dos efeitos da rotenona. Após os tratamentos, foram desenvolvidos ensaios experimentais de avaliação da cadeia de transporte de elétrons, da atividade enzimática do complexo I mitocondrial, da expressão proteica e gênica das subunidades NDUF5, S8, V1 e V2, da taxa total de espécies reativas de oxigênio e da lipoperoxidação. Já para o terceiro estudo, foi utilizada linhagem celular de macrófagos RAW 264.7, também obtidos da ATCC. Tais células foram ativadas com fitohemaglutinina (PHA) e expostas a diferentes concentrações de extrato de açaí durante 72h. Com base na concentração mais efetiva do extrato (1 µg/mL) frente à inflamação, foram realizadas as avaliações de parâmetros do metabolismo oxidativo, do ciclo celular e da expressão de citocinas inflamatórias e do inflamassoma NLRP3, via diferentes métodos experimentais. Os resultados foram estatisticamente comparados por análise de variância de uma via seguida de teste *post*

*hoc* de Tukey ou Dunnet. **Resultados:** os resultados obtidos foram organizados sob a forma de três artigos científicos. A revisão de literatura foi publicada no *Canadian Journal of Psychiatry* e indicou a relevância de estudos que identifiquem plantas com potencial propriedade de modular o complexo I mitocondrial. Os resultados obtidos no segundo estudo foram publicados na revista *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* onde se observou que o extrato hidroalcoólico de açaí apresentou níveis elevados das seguintes moléculas: orientina ( $8,05 \pm 0,03$  mg/g), ácido *p*-cumárico ( $3,52 \pm 0,01$  mg/g) e apigenina ( $3,49 \pm 0,01$  mg/g). Os resultados *in vitro* relacionados à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo mostraram que a concentração mais efetiva do extrato hidroalcoólico de açaí que aumentou a viabilidade celular foi a de 5 µg/mL após 48h de incubação. Foi observado que o extrato de açaí em ambos os modelos experimentais apresentou efeito protetor sobre o complexo I mitocondrial e este efeito deveu-se ao aumento da expressão proteica e gênica principalmente das subunidades NDUFS7 e S8 que constituem a região de atividade deste complexo. Além disso, foi evidenciada redução da taxa total de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição dos níveis de peroxidação lipídica. Os resultados do terceiro estudo foram organizados sob a forma de um manuscrito a ser submetido à revista *Inflammation Research*. Nele foi observada atividade anti-inflamatória do açaí em macrófagos RAW PHA-ativados, sendo a concentração estimada para diminuir em 50% a resposta inflamatória (EC50) de 1 µg/mL. Testes complementares mostraram que esta concentração foi capaz diminuir marcadores inflamatórios como taxa de proliferação celular, ciclo celular, níveis de EROs e de óxido nítrico. O açaí também reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ ) e relacionadas ao inflamassoma NLRP3, e também aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. **Conclusão:** os resultados obtidos sugerem que o açaí possui atividade neurofarmacológica e que é um potencial candidato no desenvolvimento de novos fármacos ou suplementos alimentares direcionados ao tratamento de doenças psiquiátricas, em especial o transtorno bipolar que está relacionado à disfunção do complexo I mitocondrial e à ativação inflamatória crônica.

**Palavras-chave:** *Euterpe oleracea* Mart. Açaí. Transtorno bipolar. Disfunção mitocondrial. Inflamação crônica.

## ABSTRACT

### NEUROPHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF *Euterpe oleracea*: AN *IN VITRO* STUDY OF THE POTENTIAL USE AT PSYCHIATRIC ILLNESS TREATMENT

AUTHOR: Alencar Kolinski Machado  
SUPERVISOR: Prof Dr Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introduction:** Neuropsychiatric diseases, as bipolar disorder (BD), have a very complex pathophysiology. Several times the diagnostic and to choose a correct treatment are difficult. Currently, have been developed studies related to mechanisms that can be associated with specific biomarkers present on mental illness. Some studies are describing an association between neuropsychiatric diseases and mitochondrial dysfunction and consequent cellular modifications. Additionally, some psychiatric illnesses are been associated with chronic inflammatory activation via pro-inflammatory cytokines production. In this sense, the search for drug development to treat psychiatric illness is very necessary. *Euterpe oleracea*, known as açai, is an Amazonian fruit and a potential candidate for neuropharmacological study due to chemical matrix, including a variety of bioactive compounds with biological effects. There are molecules that could act at mitochondrial function and neurophysiology. **Objective:** to perform a literature review about the mitochondrial dysfunction impact at bipolar disorder and chemically analyse and evaluate the neupharmacological *in vitro* effect of açai extract through mitochondrial function modulation and oxidative and inflammatory metabolisms. **Methodology:** initially we produced a review about the association between BD and cellular mitochondrial metabolism based on scientific articles published at last 20 years in different journals found at PUBMED-MEDLINE of American library. This review helped to create the eperimental *in vitro* design of this study. After, we performed an *in vitro* experimental research using a cell line SH-SY5Y exposed to rotenone. SH-SY5Y cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC®), and treated with freeze-dried hydroalcoholic açai extract which was analyzed by high performance liquid chromatography. Initially the açai effect at cell viability was measured through different concentration-effect curves. We also induced mitochondrial complex I dysfunction using rotenone at 5, 15 and 30 nM. Before and after rotenone exposition 5 µg/mL of açai extract was added to evaluate the potential effect of açai to prevent and reverse rotenone damages. After all treatments were performed experimental assays to evaluate the mitochondrial transport chain, the mitochondrial complex I enzyme activity, the protein and gene expression of NDUFS7, S8, V1 and V2 of complex I, the total levels of reactive oxygen species and lipid peroxidation. For the third study we used RAW 264.7 macrophages from ATCC. Cells were activated with PHA and exposed to different concentrations of açai extract during 72h. Using the most anti-inflammatory effective concentration of açai extract, we developed all another experimental assays to evaluate oxidative metabolism parameters, cell cycle and protein expression of cytokines and NLRP3-inflammasome. The statistical analysis was performed by one way anova followed by Tukey or Dunnett post hoc. **Results:** the obtained results were organized in three scientific articles. The review paper was published at Canadian Journal of Psychiatry and indicated the relevance of studies that dentify plants with potential properties to modulate mitochondrial complex I. The obtained results of second study were published at Oxidative and Cellular Longevity journal where we observed that hydroalcoholic açai extract presented high levels of orientin ( $8,05 \pm 0,03 \text{mg/g}$ ), *p*-cumaric acid ( $3,52 \pm 0,01 \text{mg/g}$ ) and apigenin ( $3,49 \pm 0,01 \text{mg/g}$ ). *In*

*in vitro* results related to mitochondrial dysfunction and oxidative stress showed that the most effective concentration of açai extract was 5µg/mL after 48h of incubation. We observed that açai extract at both experimental models presented protective effects under mitochondrial complex I and this effect was due to an increased protein and gene expression mainly for NDUFS7 and S8 subunits that form the active region of this complex. Despite, was observed a decreased rate of reactive oxygen species and of lipid peroxidation under açai exposition. Results of third study were organized in a manuscript that will be submitted for publication at Inflammation Research journal. It was observed the anti-inflammatory activity of açai in macrophage PHA-induced, where the effective concentration able to reduce 50% of cellular proliferation (EC50) 1 µg/mL. Complementary assays showed that this specific concentration is capable to decrease inflammatory markers as proliferation rate, cell cycle, ROS levels and nitric oxide. Açai also reduced pro-inflammatory cytokines levels (IL-1β, IL-6, TNFα, INFγ), and the inflammasome NLRP3, increasing IL-10 levels. **Conclusion:** the results obtained until this moment are suggesting that açai has neuropharmacological activity and is a potential candidate for drug development or food supplement for psychiatric diseases treatment, especially BD which is related to mitochondrial complex I dysfunction and chronic inflammatory activation.

**Keywords:** *Euterpe oleracea* Mart. Açai. Bipolar disorder. Mitochondrial dysfunction. Chronic inflammation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Ilustração representativa da realização de trabalhos epidemiológicos por país considerando a população atendida para o tratamento de esquizofrenia, transtorno bipolar, desordens alimentares até o ano de 2011 ..... 24
- Figura 2** - Funcionamento mitocondrial..... 28
- Figura 3** - Atuação de enzimas antioxidantes e efeitos dos radicais livres ..... 29
- Figura 4** - O estresse oxidativo e doenças que possuem associação com esse desbalanço... 30
- Figura 5** - Disfunção mitocondrial no complexo I com conseqüente redução na produção de ATP, aumento dos níveis de EROs e danos celulares observados no estado de estresse oxidativo celular ..... 31
- Figura 6** - Ilustração esquemática de possíveis agentes ativadores da formação do complexo proteico inflamassoma, incluindo PAMPs, DAMPs e fatores ambientais..... 39
- Figura 7** - Ilustração esquemática da oligomerização e formação do inflamassoma NLRP3 em indivíduos com transtorno bipolar e sua associação com a disfunção mitocondrial ..... 42
- Figura 8** - Ilustrações da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) ..... 48
- Figura 9** - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais desenvolvidos para avaliação do efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de açaí frente à células neuronais-like SH-SY5Y expostas a rotenona ..... 54
- Figura 10** - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais desenvolvidos para avaliação da capacidade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de açaí frente à macrófagos RAW 264,7 ativados com PHA ..... 55



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição do número de indivíduos que recebem atendimento especializado quanto a doenças neuropsiquiátricas mais e menos prevalentes em diferentes regiões do mundo .....24
- Tabela 2** - Descrição das funções biológicas desempenhadas pela IL-1 $\beta$  e IL-18.....40



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT<sub>2</sub>: Receptor serotoninérgico do tipo 2  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AP-1: Ativador de proteína-1  
ASC: Proteína adaptadora associada a apoptose contendo o domínio CARD  
ATP: Adenosina trifosfato  
Ca<sup>2+</sup>: Cálcio  
CAPS: Síndrome periódica associada à criopirina  
CAT: Catalase  
Células NK: Células Natural Killer  
COX-2: Cicloxigenase-2  
D<sub>2</sub>: Receptor dopaminérgico do tipo 2  
DAMP: Substância decorrente de injúria tecidual  
DXR: Cloridrato de doxorubicina  
EROs: Espécies reativas de oxigênio  
Fe<sup>2+</sup>: Ferro  
GABA: Neurotransmissor inibidor ácido gama-aminobutírico  
GM-CSF: Fator de crescimento de macrófagos  
GPx: Glutathione peroxidase  
GSK-3 $\beta$ : Glicogênio sintase quinase 3 $\beta$   
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio  
HDAC: Desacetilase de histonas  
IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$   
IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$   
IL-2/ 4/ 6/ 18: Interleucina-2/ 4/ 6/ 18  
IRF-3: Fator 3 de regulação de interferon  
LPS: Lipopolissacarídeo  
MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1  
MSU: Agente indutor de produção de EROs  
NF $\kappa$ B: Fator nuclear  $\kappa$ B  
NLRP3: *Nod-like receptor family pyrin domain-containing 3*  
NO: Óxido Nítrico  
O<sub>2</sub>: Oxigênio  
OH $\cdot$ : Radical hidroxila  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PAMP: Agente infeccioso patogênico  
PYD: Domínio de pirina  
SOD2: Superóxido dismutase dependente de manganês  
TLR: Receptores do tipo *Toll*  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral- $\alpha$   
WHO: World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1	DOENÇAS NEUROSIQUIÁTRICAS: O TRANSTORNO BIPOLAR COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA.....	23
1.2	O METABOLISMO OXIDATIVO CELULAR E SUA RELAÇÃO COM O TRANSTORNO BIPOLAR .....	27
1.3	O SISTEMA INFLAMATÓRIO E SUA RELAÇÃO COM O TRANSTORNO BIPOLAR .....	32
1.4	RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E O SISTEMA OXIDATIVO CELULAR.....	37
1.5	TERAPIA FARMACOLÓGICA NO TRANSTORNO BIPOLAR .....	43
1.6	PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAIS EFEITOS FARMACOLÓGICOS ...	46
1.7	POTENCIAL AÇÃO NEUROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (AÇAÍ) .....	48
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	51
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
	Manuscrito 1.....	57
	Manuscrito 2.....	71
	Manuscrito 3.....	89
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>125</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO (CONSIDERAÇÕES GERAIS).....</b>	<b>135</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>137</b>





## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS: O TRANSTORNO BIPOLAR COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

As doenças neuropsiquiátricas representam um grande problema de saúde pública mundial e brasileira. Investigações epidemiológicas feitas na década de 90, já estimavam que cerca de 30% da população brasileira adulta havia apresentado algum tipo de transtorno psiquiátrico no período de um ano, incluindo transtornos mentais de considerável gravidade como a esquizofrenia, que na época já afetava cerca de 1% da população no Brasil (OMS, 1993). Estudo realizado pela *Global Burden of Disease* em 1996 já relatava que as doenças de caráter neuropsiquiátrico eram responsáveis por cerca de um quarto das condições de perda da saúde, sendo 20 vezes superior as atribuições relacionadas ao câncer e oito vezes superior à doenças cardíacas, neste sentido (MURRAY e LOPEZ, 1996).

Considerando um paradigma mais amplo, os transtornos mentais se caracterizam como uma das principais causas de morbidade mundial afetando cerca de 5 a 25% da população (WHO, 2004). Já considerando o Brasil, estima-se que 5 milhões de indivíduos apresentem transtornos psiquiátricos graves (WHO, 2015). Tendo como base os estudos mais recentes de caráter epidemiológico, tais doenças mentais podem ser classificadas em altamente prevalentes e menos prevalentes. Dentre as mais prevalentes encontra-se a depressão maior, a distímia e desordens de ansiedade, já entre as menos prevalentes, mas não menos importantes, estão a esquizofrenia, o transtorno bipolar e desordens de alimentação, todavia, os dados obtidos são baseados em estudos de prevalência e incidência de tais problemáticas públicas considerando o número de indivíduos que recebem atendimento especializado (tabela 1) e existe uma disparidade entre regiões e países quanto ao número de tais estudos (figura 1), o que por vez pode comprometer esta classificação, demonstrando assim a necessidade e importância da efetivação de estudos epidemiológicos de qualidade (BAXTER et al., 2013).



no mundo enquanto o transtorno bipolar acomete em torno de 60 milhões de indivíduos. Além disso, é destacado que o desenvolvimento de tais desordens mentais está não somente relacionado a atributos individuais, como gerenciamento de pensamento, emoções, comportamentos e interações com a sociedade, mas também inclui diversos fatores sociais, econômicos, culturais, ambientais e políticos, tais como condições de trabalho e normativas de vida.

No início do século 20 Kraepelin, um psiquiatra alemão, descreveu pela primeira vez os sinais e sintomas da psicose maníaco-depressiva. Todavia, com a publicação da terceira edição do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* em 1980, esta doença passou a ser nomeada de transtorno bipolar (*American Psychiatric Association*, 1980). Tanto o transtorno bipolar quanto a depressão unipolar passaram a ser classificadas como transtornos de humor, onde o indivíduo apresenta variações de humor que desencadeiam vários sintomas característicos de cada distúrbio (DEL PORTO et al., 2005).

O transtorno bipolar é uma doença psiquiátrica severa, grave e prevalente que se faz presente em mais de 3% da população mundial e em cerca de 4% da população adulta brasileira. Tal doença é caracterizada por sintomas clínicos que incluem períodos que oscilam entre estados de mania e depressão, assim como efeitos psicóticos, o que muitas vezes acaba por dificultar o diagnóstico, pois apesar de possuir prognóstico pior, os sintomas se assemelham à doença depressiva maior, bem como compartilha de uma fisiopatologia semelhante com outras doenças psiquiátricas (JUDD et al., 2008; ABTB, 2013; EMSLEY et al., 2013). No caso, a ocorrência de estados psicóticos, estes são caracterizados pela “perda do contato com a realidade”, fazendo jus ao termo psicose que é oriundo do grego “psique”, para mente, e “ose”, para condição anormal, significando literalmente, condição anormal da mente (KLINGER et al., 2013).

Quanto a classificação do transtorno bipolar, existe o tipo I, ocorrendo episódios de depressão e de mania ou mistos, como também há o tipo II, também chamado de hipomaníaco (*American Psychiatric Association*, 2000; AKISKAL, 2009), sendo que ambos os tipos tendem a evoluir com vários estados de recorrência (JUDD et al., 2002; JUDD et al., 2003). Para a realização do diagnóstico e classificação do distúrbio apresentado, além da avaliação psíquica, se faz necessário considerar os aspectos evolutivos da doença devido as grandes variações de padrões de alternância dos estados de humor em cada episódio efetivo (STRAKOWSKI et al., 2011), para que assim possa ser indicado e realizado o tratamento mais adequado (MATZA et al., 2005). No diagnóstico de transtorno bipolar do tipo I, o indivíduo deve ter apresentado no mínimo um episódio de mania ou misto, ocorrendo

geralmente em sujeitos que já apresentaram períodos depressivos. Por outro lado, o indivíduo com transtorno bipolar do tipo II não possui períodos maníacos e sim deve ter apresentado pelo menos um episódio hipomaníaco, porém tal distinção, muitas vezes, não é facilmente realizada (BENAZZI et al., 2005). Além disso, o maior erro diagnóstico que pode acontecer com tais indivíduos é durante um episódio depressivo ser feito o diagnóstico de depressão unipolar, pois nesse caso, o tratamento farmacológico indicado é equivocado (FRANCES e JONES, 2012). No estudo prospectivo realizado por Ghaemi e colaboradores (1999), por exemplo, foi observado que cerca de 40% dos indivíduos de um hospital, diagnosticados com transtorno bipolar do tipo I, haviam sido previamente diagnosticados com depressão unipolar. Dessa forma, Akiskal e Pinto (1999), com o intuito de atualizar e facilitar o diagnóstico do transtorno bipolar sugeriram outras classificações além dos tipos I e II, incluindo os tipos III e IV, os quais seriam referentes a casos mais raros. Segundo os autores, o transtorno bipolar do tipo III refere-se a episódios de hipomania vinculados ao uso de medicamentos antidepressivos e farmacoterapias somáticas, enquanto que o tipo IV seria direcionado a indivíduos que apresentem períodos de depressão quando mais velhos que o tradicional, acompanhados de características atípicas, como hipersexualidade e hipersonolência. Mais recentemente, Angst e colaboradores (2003) recomendaram a inclusão de outras classificações ao espectro bipolar, incluindo a depressão leve, hipomania pura e o transtorno bipolar menor. Enquanto a depressão leve faz referência a distímia e a depressão menor, o transtorno bipolar menor refere-se a situações de depressão leve com hipomania durante somente 2 meses do ano, resgatando os quadros maníacos e hipomaníacos puros (SALLET e GATTAZ, 1998; ANGST et al., 2003).

Contudo, o transtorno bipolar vem se caracterizando como uma problemática de saúde pública mundial, pois possui altos custos financeiros às organizações de saúde e está associado à mortalidade prematura, independente das condições econômicas do país (ROSHANA EI-MOGHADDAM e KATON, 2009). O sofrimento, morbidade e mortalidade atribuídas ao transtorno bipolar não são apenas sintomas da doença, mas sim consequência de recorrências (BAUER et al., 2005). Indivíduos que apresentam um grande número de recorrências recebem pior prognóstico com provável menor resposta aos métodos terapêuticos, com maiores problemas sociais, geralmente incluindo o desemprego e consequentemente maiores despesas aos órgãos públicos em saúde, do que aqueles acometidos pela doença, mas sem comorbidade (ANGST et al., 2002; TSAI et al., 2005; WILLIAMS et al., 2011). No estudo de Williams e colaboradores (2011) foi demonstrado que os custos referentes a cuidados médicos e hospitalizações de pacientes com transtorno bipolar

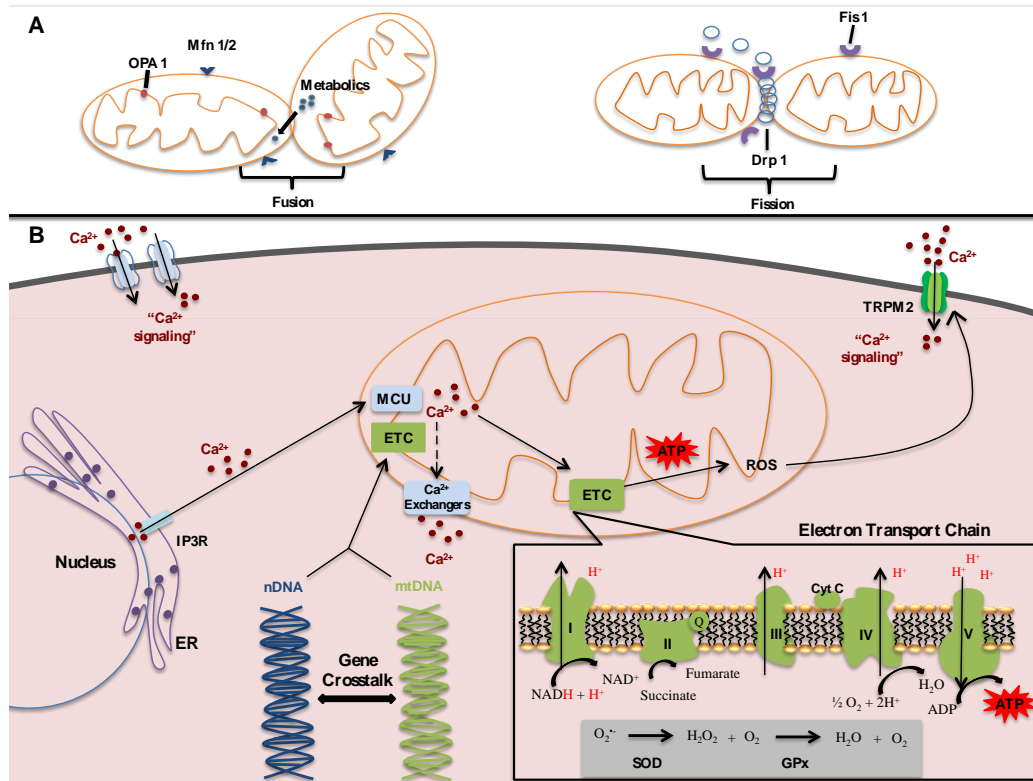
são significativamente mais elevados do que as despesas gastas com pacientes que apresentem outras doenças crônicas, incluindo depressão maior, asma e doença cardíaca, sendo superado apenas pelo diabetes, destacando a grande necessidade de atendimento especializado em saúde que os indivíduos com transtorno bipolar fazem demanda.

Dessa forma, o interesse sobre o entendimento do transtorno bipolar vem aumentando progressivamente na área de estudo da psiquiatria, buscando-se por novos conceitos e reformulações que demonstrem a provável fisiopatologia dessa doença (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2006; AKISKAL et al., 2006). Recentemente, estudos científicos vêm descrevendo a associação entre doenças psiquiátricas, o metabolismo oxidativo celular e inflamatório, bem como suas consequências a nível de alterações na homeostase celular e modificações na expressão de determinados genes, tanto a nível mitocondrial quanto nuclear. Tais evidências sugerem, por exemplo, que o transtorno bipolar, a esquizofrenia e até mesmo a depressão maior apresentam relação com deficiência na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, assim como ativação inflamatória crônica. Dessa forma, estes tipos de alterações associadas a doenças neuropsiquiátricas estão ganhando destaque nos estudos que objetivam o aprofundamento do entendimento da fisiopatologia de tais doenças. Essas investigações estão voltadas ao descobrimento de novos biomarcadores que possam ser utilizados para facilitar o diagnóstico, como também para serem utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos que possam atuar em alvos terapêuticos mitocondriais e/ou inflamatórios de forma a recuperar a homeostase celular (ANDREAZZA et al., 2010; KIM et al., 2015; KIM et al., 2016).

## 1.2 O METABOLISMO OXIDATIVO CELULAR E SUA RELAÇÃO COM O TRANSTORNO BIPOLAR

A mitocôndria é uma organela celular fundamental, pois é a maior fonte de produção energética das células, através da produção de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto, esta organela também é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), estando intimamente vinculada ao funcionamento e homeostase celular (MALKUS et al., 2009; STRECK et al., 2013). Sabe-se que a mitocôndria em condições fisiológicas atua através da cadeia de transporte de elétrons para a produção de ATP, como também está envolvida no metabolismo do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e apresenta atividade dinâmica, a qual é indispensável ao ciclo celular (TWIG et al., 2008; SANTO-DOMINGO e DEMAUREX, 2010; ATKIN et al., 2011; RIZZUTO et al., 2012; LIESA e SHIRIHAI, 2013) (figura 2 A e B).

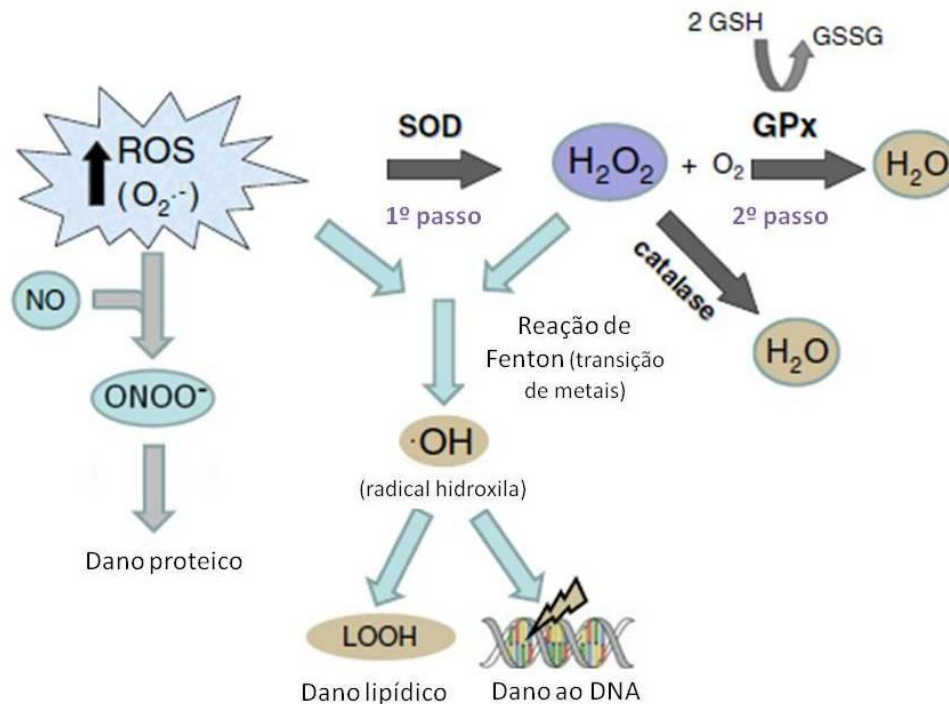
**Figura 2** - Funcionamento mitocondrial. (A) mecanismos de fusão e fissão mitocondrial evidenciadas durante o processo de replicação celular devido à demanda energética; (B) interação mitocondrial no metabolismo do cálcio; processo de expressão gênica de genes associados a montagem mitocondrial; e o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons na produção de ATP.



Fonte: o próprio autor, Machado e colaboradores (2016).

Durante a produção energética uma pequena quantidade dos elétrons que atravessam a membrana mitocondrial através dos complexos mitocondriais acaba escapando do fluxo e por sua vez reduzem o oxigênio ( $O_2$ ) ao ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). O radical  $O_2^{\cdot-}$ , produzido na mitocôndria, é então dismutado pela ação da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), formando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esta espécie intermediária de oxigênio, ainda na mitocôndria, é então catalisada em água e oxigênio pela enzima glutathione peroxidase (GPx) (figura 3) (GOLDSTEIN et al., 1993; KIRKINEZOS e MORAES, 2001; VALKO et al., 2007).

**Figura 3** - Atuação de enzimas antioxidantes e efeitos dos radicais livres.



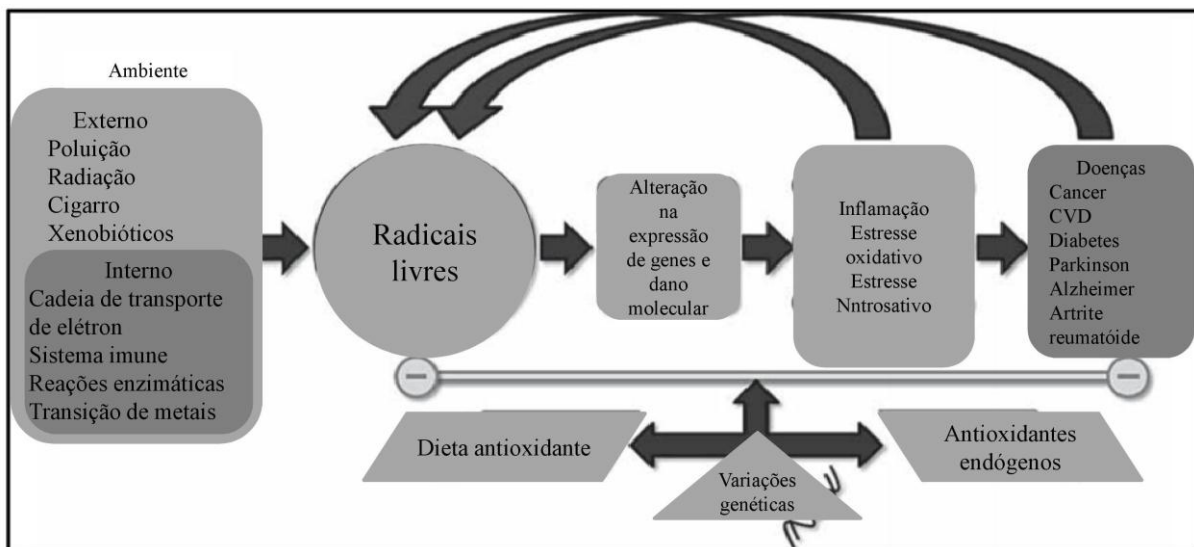
Fonte: adaptada de Rosenfeldt e colaboradores (2013).

Entretanto, níveis elevados de  $H_2O_2$  produzidos pela mitocôndria podem se deslocar para o citoplasma, e neste local reagir com metais de transição, especialmente o ferro ( $Fe^{2+}$ ), produzindo o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), por reação denominada reação de Fenton. Por sua vez, o  $\cdot OH$  produzido, atua como uma molécula altamente reativa e genotóxica, uma vez que possui grande afinidade ao DNA, causando quebras e mutações. Esta molécula também causa lipoperoxidação e oxidação de proteínas induzindo assim a disfunções celulares importantes que conduzem a perda da homeostase (KIRKINEZOS e MORAES, 2001; VALKO et al., 2007).

Adicionalmente ao sistema antioxidante enzimático celular, formado principalmente pela SOD, GPx e pela catalase (CAT), onde esta última funciona de maneira similar a GPx transformando o  $H_2O_2$  em água, há o sistema antioxidante não-enzimático, o qual também possui a capacidade de neutralizar EROs de forma a prevenir possíveis danos celulares. A maior parte de tais moléculas antioxidantes não-enzimáticas são provenientes da alimentação e encontradas em frutos e vegetais e são denominadas substâncias bioativos devido à capacidade que possuem de interagir com o organismo. Dessa forma, indivíduos que apresentam hábitos alimentares mais saudáveis possuem potencialmente uma resposta antioxidante mais eficaz frente a possíveis desbalanços oxidativos e ao chamado estresse oxidativo (FITO et al., 2007; RODRIGO et al., 2007; VICENT et al., 2007).

Todavia, apesar das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, há situações que podem causar um desbalanço oxidativo celular, também conhecido como estresse oxidativo. Logo, o estresse oxidativo pode ser entendido como o desbalanço entre a quantidade de EROs em relação às defesas antioxidantes. Em condições fisiológicas, as EROs atuam positivamente na proteção do organismo contra micro-organismos e no funcionamento celular, como mediador de sinalização de proliferação e diferenciação celular (GOUGH e COTTER, 2011; RUPÉREZ et al., 2014). Porém, o aumento na produção de EROs ou a redução na produção de enzimas antioxidantes caracteriza o estresse oxidativo e compromete o funcionamento celular (RUPÉREZ et al., 2014). Várias doenças crônicas têm sido associadas ao desbalanço oxidativo celular, incluindo o câncer (da COSTA et al., 2012), obesidade (RUPÉREZ et al., 2014), diabetes, doenças cardíacas (VALKO et al., 2007) e até mesmo doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (WANG et al., 2009; ANDREAZZA et al., 2010; BROWN et al., 2014) (figura 4).

**Figura 4** - O estresse oxidativo e doenças que possuem associação com esse desbalanço.



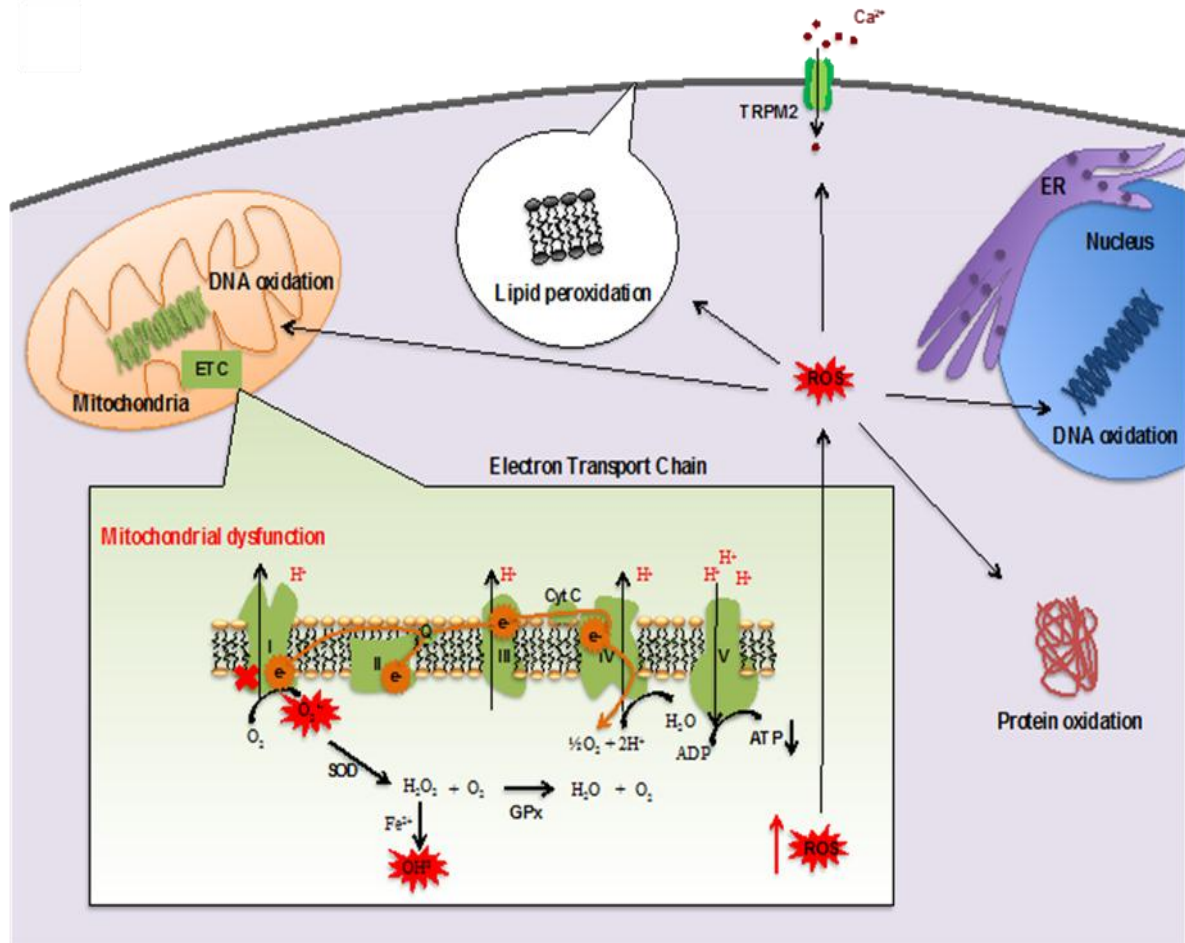
Fonte: adaptado de Costa e colaboradores (2012).

Estudos experimentais recentes sugerem que algumas doenças neuropsiquiátricas estão relacionadas à disfunção mitocondrial, envolvendo não somente a produção de ATP, mas também a dinâmica mitocondrial, o metabolismo do fluxo de  $Ca^{2+}$  e a expressão de genes mitocondriais e nucleares vinculados à estrutura mitocondrial. Esta associação, na realidade, aumenta a complexidade de tais patologias. Tanto indivíduos com esquizofrenia quanto com transtorno bipolar, por exemplo, apresentam alterações oxidativas por deficiência na atividade funcional mitocondrial, especialmente na cadeia de transporte de elétrons, com consequente



estresse oxidativo, danos proteicos, lipídicos e genéticos, comprometendo a homeostase celular (figura 5). Porém, a disfunção mitocondrial encontrada em indivíduos com transtorno bipolar parece ser distinta da encontrada em sujeitos com esquizofrenia (ANDREAZZA et al 2007).

**Figura 5** - Disfunção mitocondrial no complexo I com conseqüente redução na produção de ATP, aumento dos níveis de EROs e danos celulares observados no estado de estresse oxidativo celular.



Fonte: o próprio autor, Machado e colaboradores (2016).

O transtorno bipolar é associado com uma significativa redução na expressão de genes que codificam proteínas que formam subunidades do complexo mitocondrial NADH-coenzima Q oxireductase (complexo mitocondrial I), principalmente as proteínas NDUFS7 e NDUFS8. Desse modo, pacientes com transtorno bipolar apresentam desbalanço redox, principalmente em decorrência de uma perda de função do complexo mitocondrial I, conduzindo a uma suscetibilidade a redução da produção de ATP, geração excessiva de EROs, (SCOLA et al., 2013) e conseqüentes danos celulares oxidativos (WANG et al., 2009; ANDREAZZA et al., 2010; BROWN et al., 2014). No estudo desenvolvido por Andrezza e

colaboradores (2010), por exemplo, utilizando amostras córtex frontal pós-morte de indivíduos com transtorno bipolar, esquizofrenia e depressão maior, foi encontrado um perfil específico para os indivíduos com transtorno bipolar, quando comparado ao grupo controle. Neste mesmo estudo, o grupo de transtorno bipolar apresentou redução na atividade enzimática do complexo mitocondrial I, bem como diminuição na expressão proteica da proteína NDUFS7, a qual é uma importante subunidade que compõe o complexo mitocondrial I, justificando a redução na atividade deste complexo. Além disso, na pesquisa de Andrezza e colaboradores (2013), onde também foram usadas amostras de pós-morte de córtex frontal de sujeitos com transtorno bipolar, foi observada redução da expressão proteica da subunidade NDUFS7, bem como uma tendência a redução da expressão da subunidade NDUFS8, com correlação positiva entre ambas as subunidades quando comparado ao grupo de sujeitos não acometidos por doenças neuropsiquiátricas. Mais recentemente, Kim e colaboradores (2016) também demonstraram achados semelhantes aos descritos anteriormente. As amostras incluíram córtex frontal de indivíduos com transtorno bipolar ou esquizofrenia e foi demonstrado que o grupo de transtorno bipolar apresenta níveis significativamente reduzidos para o complexo mitocondrial I, comparado ao grupo controle, enquanto que para os demais complexos não foi observada nenhuma diferença relevante. Os autores também relataram redução da expressão proteica da proteína NDUFS7, o que por vez não foi visualizado em amostras de indivíduos com esquizofrenia. Além disso, assim como já mencionado, indivíduos com transtorno bipolar apresentam dois episódios de humor característicos principais, mania e depressão (OMS, 2015). Durante a fase de mania a atividade mitocondrial pode estar aumentada, com alta geração de ATP em virtude da grande demanda de neurotransmissão. Todavia, durante a fase de depressão, tais sujeitos podem apresentar um “desligamento mitocondrial”, o que por sua vez acaba por conduzir a uma diminuição na produção energética e metabolismo mitocondrial (BROWN et al., 2014; MACHADO et al., 2016). Logo, o transtorno bipolar é uma patologia psiquiátrica de grande complexidade e que requer muita atenção na intenção de desenvolver pesquisas de novos biomarcadores que possam facilitar o entendimento, diagnóstico e tratamento desta doença.

### 1.3 O SISTEMA INFLAMATÓRIO E SUA RELAÇÃO COM O TRANSTORNO BIPOLAR

O sistema imunológico tem por função principal a proteção do organismo contra potenciais agentes ou situações que possam desencadear alterações morfofuncionais indesejáveis. Basicamente, a função imunológica é dividida em duas classificações principais:

imunidade inata e imunidade adaptativa ou adquirida (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010).

O sistema imune inato é responsável por respostas imunológicas imediatas e acontece através de barreiras físicas, químicas e biológicas que são produzidas por moléculas e células altamente especializadas. Tal resposta não é dependente do organismo já ter entrado em contato prévio com um determinado agente agressor ou não. Por outro lado, o sistema imune adquirido apresenta maior complexidade, pois envolve também os linfócitos que atuam de modo a desenvolver respostas imunológicas específicas a um determinado agente agressor que ative tal sistema. Todavia, apesar da existência dessas divisões funcionais, a resposta imunológica atua de forma integrada e interativa entre ambas as vias, a fim de garantir a proteção do organismo, mantendo-o em homeostase, com bom funcionamento e saudável (CRUVINEL et al., 2010; RABOLLI et al., 2016).

Em uma resposta imune inata, as principais células com capacidade efetora são os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* – NK, além de plaquetas e células endoteliais (ABBAS et al., 2014). Nesse sistema, que regula diretamente processos inflamatórios, os monócitos/macrófagos têm um papel destacado. Estas células fazem parte do sistema fagocítico mononuclear e constituem 3% a 8% dos leucócitos circulantes na corrente sanguínea. Os monócitos presentes no sangue se originam dos pró-monócitos localizados na medula óssea. Quando ocorre algum tipo de invasão microbiana ou lesão tecidual, os monócitos deixam a circulação sanguínea e se infiltram nos tecidos, sofrendo alterações citofisiológicas, sendo então chamados de macrófagos, os quais desempenham suas funções fagocíticas (AUFFRAY et al., 2007; CRUVINEL et al., 2010). Tais funções celulares, supostamente, apresentam também correlação com aspectos hormonais. Enquanto o estrogênio não demonstra padrão muito claro frente a células inflamatórias, a testosterona atua como imunossupressor (FOO et al., 2016). Dessa forma, sugestivamente, a intensidade de ativação imunológica pode ser dependente de características de gênero (ROVED et al., 2016).

Durante uma resposta inflamatória, os monócitos/macrófagos apresentam papel essencial, pois desempenham uma grande quantidade de funções importantes, dentre as quais, o controle do início e a resolução da inflamação através do processo de fagocitose, liberação de citocinas pró-inflamatórias e em seguida anti-inflamatória, produção de EROs, além da subsequente ativação do sistema imune adquirido (FAHY et al., 1999; AUFFRAY et al., 2007).

Em situações normais, ou sem a presença de agentes infecciosos ou lesões teciduais, os monócitos circulam na corrente sanguínea por curto período de tempo antes que entrem em processo de apoptose celular, fisiologicamente (FAHY et al., 1999). Todavia, em resposta a fatores estimulantes de diferenciação celular, os monócitos resistem à morte celular programada e originam os macrófagos, que são células que podem manter-se viáveis por um longo período de tempo em um tecido corporal lesionado (WIKTOR-JEDRZEJCZAK et al., 1996). Então, a presença de fatores mediadores, incluindo antígenos, atua por inibir a apoptose dos monócitos que se diferenciam em macrófagos, desempenhando a sua função fagocítica. Por outro lado, assim que o agente agressor é eliminado, o processo inflamatório se resolve e a cascata apoptótica de tais células é reestabelecida (SAVILL e FADOK, 2000).

Além das células do sistema inflamatório/ imunológico, existem proteínas que desempenham papel primordial em tais processos de resposta do organismo, as chamadas citocinas. Desse modo, a resposta inflamatória também pode ser descrita como uma ativação da cascata de citocinas pró-inflamatórias e fatores complemento. Durante a ativação inflamatória, inicialmente a produção e os níveis sanguíneos de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumoral necrosis factor- $\alpha$* ) se elevam atuando como mediadores primários da inflamação. A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  atuam ativando a produção do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor  $\kappa$ B*). Já o NF $\kappa$ B por sua vez atua por ativar demais citocinas, incluindo IL-6, IL-8 e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (GORDON e MARTINEZ, 2010). Por outro lado, o sistema imunológico conta também com citocinas anti-inflamatórias, como é o caso da IL-10, que é capaz de atenuar a resposta inflamatória após a resolução do agente causal da inflamação, inibindo, por exemplo, a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (DHANDE et al., 2015).

Apesar da grande importância e benefícios proporcionados pelo sistema imune, via ativação inflamatória, este sistema necessita desempenhar suas funções de forma controlada. Quando a resposta inflamatória é ativada de maneira inapropriada, o organismo pode apresentar resposta inflamatória crônica ou mesmo contra antígenos específicos dos próprios tecidos, neste caso, caracterizando as doenças autoimunes (BETTELLI et al., 2006; IVANOV et al., 2006; O'CONNELL et al., 2010). As doenças autoimunes se estabelecem quando o organismo perde a capacidade de reconhecer as próprias células teciduais e passa a produzir anticorpos específicos para tais células de modo a destruí-las. Exemplos de doenças deste tipo são, a doença de Hashimoto, a Anemia Perniciosa, a Doença de Addison, o Diabetes do tipo I, dentre outras, e infelizmente, para muitas destas, ainda não se possui conhecimento quanto aspectos etiológicos (WIERSINGA, 2016; BASHA et al., 2016).

Alguns estudos vêm descrevendo a presença da resposta inflamatória crônica em muitas patologias com as quais não se possuía tal conhecimento previamente. O sistema imune mostra-se cronicamente ativado em indivíduos que apresentam, por exemplo, obesidade (BYUNG-CHEOL e JONGSOON, 2014), diabetes (VOZAROVA et al., 2001), hipercolesterolemia e problemas cardíacos (KRALISCH e FASSHAUER, 2013), bem como parece estar envolvido no desenvolvimento de cânceres (BALKWILL e MANTOVANI, 2012; KIDANE et al., 2014) e até mesmo de doenças neuropsiquiátricas, como a esquizofrenia e o transtorno bipolar (ANDREAZZA et al., 2010; ANDREAZZA et al., 2013). Já em 1863, o pesquisador Rudolf Virchow defendia a teoria de que o aparecimento de muitos cânceres possuía íntima correlação com o sistema imunológico, via ativação crônica de uma resposta inflamatória (VIRCHOW, 1863). Com o avançar das pesquisas científicas e dos estudos de caráter epidemiológico demonstrou-se que cerca de 25% das neoplasias apresentam relação com a resposta inflamatória (SAIGO et al., 2008; BALKWILL e MANTOVANI, 2012). Além disso, como já se sabe, as células neoplásicas surgem em virtude de danos ao DNA que não são reparados pela maquinaria de reparo celular (LOEB, 2011). Uma característica bastante presente em indivíduos com inflamação crônica são os infiltrados celulares, principalmente de macrófagos, neutrófilos e linfócitos e justamente nestes locais, ocorrem danos recorrentes ao DNA, os quais podem dificultar o funcionamento da maquinaria de reparo (KIDANE et al., 2014). Adicionalmente, os infiltrados de células inflamatórias produzem altas concentrações de EROs, pois ajudam a mediar a sinalização da inflamação (BARNES e LINDAHL, 2004) e tais moléculas em excesso também atuam de modo a lesionar o DNA (SVILAR et al., 2011).

O papel de processos inflamatórios tem sido altamente descrito e reconhecido em doenças neurodegenerativas e neurocognitivas (HAMDANI et al., 2013; LEBOYER et al., 2012). A patofisiologia da depressão maior, por exemplo, possui relevante associação com processos inflamatórios e interação com o sistema neuro-imune (MAES et al., 2011). Assim como sujeitos com esquizofrenia possuem índices elevados de diversas citocinas pró-inflamatórias e neste caso a neuro-inflamação apresenta associação com a indução da diminuição do volume da substância cinzenta cortical cerebral, o que é um aspecto que caracteriza esta doença (ZHANG et al., 2016).

Além da disfunção mitocondrial mencionada anteriormente, existe também uma ativação inflamatória encontrada em indivíduos com transtorno bipolar e este fato parece estar vinculado à fisiopatologia desta doença neuropsiquiátrica, sendo um dos achados mais consistentes nesses indivíduos (ANDREAZZA et al., 2010; CLAY et al., 2011; BERK et al.,

2011; KONRADI et al., 2012; SCOLA et al., 2013). Segundo Berk e colaboradores (2011), a neuroprogressão observada no transtorno bipolar, além de possuir associação com o estresse oxidativo, questões ambientais e aspectos genéticos, também envolve aspectos inflamatórios. Ryan e colaboradores (2006) relatou que indivíduos com transtorno bipolar apresentam expressão gênica aumentada de genes relacionados à resposta imunológica. Além disso, pesquisas desenvolvidas utilizando amostras de córtex pré-frontal de indivíduos com transtorno bipolar, demonstraram aumento significativo de genes mediadores inflamatórios, e tal evidência possui correlação com a duração da doença, sendo mais presente em sujeitos acometidos pela doença durante mais tempo (NARAYAN et al., 2008; RAO et al., 2010). Adicionalmente, monócitos de pessoas com bipolaridade, bem como de seus descendentes próximos, apresentam índices elevados de expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo, por exemplo, os genes das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (PADMOS et al., 2008; STUART e BAUNE, 2014). Tais evidências foram também fortemente comprovadas através de estudos mais contemporâneos, de forma a demonstrar a presença de níveis significativamente elevados de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com transtorno bipolar, tanto a nível cerebral, quanto sanguíneo (NAKAHIRA et al., 2011; ZHOU et al., 2011; LÓPEZ-ARMADA et al., 2013). Todavia, os níveis de citocinas pró-inflamatórias parecem ser dependentes do estágio da doença em que a pessoa se encontra, já que no estudo de Brietzke e colaboradores (2009) foi descrito que durante o estado de mania, as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- $\alpha$ , apresentam-se elevadas, enquanto que na fase de depressão, apenas a IL-6 possui elevação significativa, quando comparado a indivíduos que não apresentam nenhuma doença neuropsiquiátrica. Assim como os níveis de citocinas, receptores celulares específicos de citocinas também mostram-se elevados em tais indivíduos, um exemplo é a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1, do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) (BAI et al., 2014; BAI et al., 2015; JAKOBSSON et al., 2015). Aspectos genéticos também influenciam na ativação inflamatória em indivíduos com transtorno bipolar, no estudo de Tokac e colaboradores (2016), por exemplo, foi demonstrado que existem polimorfismos genéticos de receptores de citocinas que são mais prevalentes em células de sujeitos com bipolaridade. Neste estudo os autores relataram uma prevalência significativamente aumentada do genótipo guanina-guanina (GG) para o gene MCP-1, sendo este genótipo sugestivo como biomarcador de risco aumentado para o desenvolvimento do transtorno bipolar.

A resposta inflamatória crônica no transtorno bipolar pode causar outros efeitos deletérios no organismo. Levantamentos epidemiológicos realizados há alguns anos atrás,

demonstraram que uma grande quantidade de indivíduos acometidos pelo transtorno bipolar apresentavam também, ou durante a progressão da doença, problemas cardíacos (LASSER et al., 2000). Inicialmente tal fato foi associado ao tratamento farmacológico direcionado a esses pacientes, já que alguns estabilizadores do humor podem conduzir ao aumento do peso corporal e à resistência a insulina (PARSONS et al., 2009). Todavia, mais recentemente, em decorrência das descobertas a cerca das respostas inflamatórias crônicas presentes nesses indivíduos, passou-se a acreditar que tal vínculo, entre o transtorno bipolar e alterações cardíacas e demais problemas metabólicos decorrentes, sejam em virtude da ativação da cascata inflamatória e indução inflamatória descontrolada (LEBOYER et al., 2012).

Sendo assim, pode-se dizer que tais mediadores da resposta inflamatória, não somente desempenham papel chave na proteção do organismo frente a agentes potencialmente infecciosos ou que possam causar danos teciduais, mas também atuam de modo a contribuir no controle da neurogênese, na liberação de neurotransmissores, na produção de proteínas neurais, bem como no controle da permeabilidade da barreira hematoencefálica, caracterizando-se como um estado fortemente presente em indivíduos com doenças neuropsiquiátricas, especialmente o transtorno bipolar (STUART e BAUNE, 2014). Logo, acredita-se que tal aspecto possa ser utilizado como potencial biomarcador e alvo farmacoterapêutico de tais indivíduos.

#### 1.4 RELAÇÃO ENTRE A ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA E O SISTEMA OXIDATIVO CELULAR

A inflamação pode ser classicamente ativada por meio de agentes infecciosos patogênicos (PAMPs, do inglês *pathogen associated molecular patterns*) que mediam a inflamação, ou pela liberação de substâncias em decorrência de injúria tecidual (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*), as quais são responsáveis pela ativação da inflamação estéril (TAKEUCHI e AKIRA, 2010; CHEN e NUÑEZ, 2010). Todavia, tanto em condições de inflamação via PAMPs ou DAMPs há em comum um mediador muito importante, o estresse celular (CHOVATIYA e MEDZHITOV, 2014).

Nesse sentido, Lavieri e colaboradores (2015) sugerem que o estresse celular induz a formação de proteínas defeituosas por desdobramento da cadeia peptídica e tais proteínas são capazes de recrutar processos inflamatórios crônicos. Proteínas que não em sua forma tridimensional correta acabam por se acumular no retículo endoplasmático, o qual por sua vez muitas vezes perde a capacidade de desempenhar suas funções (JANSSENS et al., 2014). As

células possuem um sistema de reparo de proteínas disfuncionais, porém muitas vezes tal maquinaria não consegue suprir adequadamente a demanda intracelular e as proteínas danificadas se acumulam e muitas vezes acabam por interagir com vias inflamatórias, aumentando a produção de EROs, de NFκB e fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como o fator 3 de regulação de interferon (IRF-3). Logo, a produção de proteínas danificadas pode ser uma via ligada ao estresse celular que atua sinergicamente na ativação da cascata inflamatória (MARTINON et al., 2010). Monócitos de indivíduos com síndrome periódica associada à criopirina (CAPS, do inglês *cryopirin-associated periodic syndromes*) são exemplos de células com perda de homeostase e estresse celular em resposta a produção incorreta da proteína NLRP3 (do inglês, *nod-like receptor family pyrin domain-containing 3*), proteína principal que compõe o inflamassoma NLRP3. Essa é uma família de desordens hereditárias onde os indivíduos acometidos apresentam episódios recorrentes de febre, com produção de auto-anticorpos órgão-específicos (TASSI et al., 2010).

O inflamassoma é um complexo de diferentes proteínas que inclui a proteína NLR, uma proteína adaptadora associada a apoptose contendo o domínio CARD (ASC) e a pró-caspase-1. Assim que a proteína NLR é ativada via algum agente mediador, há a formação do complexo pentamérico ou heptamérico pelos 3 componentes principais. Logo, o inflamassoma atua como um indutor pró-inflamatório via ativação da caspase. As caspases fazem parte da família das cisteína-aspartato proteases e desempenham suas funções principalmente a nível de apoptose, necrose, regulação do ciclo celular e processos inflamatórios (SALEH et al., 2006). Durante o acionamento inflamatório, as caspases que podem ser ativadas incluem caspases 1, 4, 5, 11 e 12. O estresse observado no retículo endoplasmático, como citado anteriormente, em decorrência do acúmulo de proteínas disfuncionais, pode acionar as caspases 4 e 12, por exemplo. Já a caspase 8 está envolvida na proliferação celular e ativação de linfócitos T (LAVIERI et al., 2015). Tais proteínas podem ainda ser divididas em iniciadoras e executoras. Caspases iniciadoras possuem em sua estrutura uma porção N-terminal e uma região C-terminal, sendo esta última, a parte catalítica desta enzima. Todavia, para o funcionamento das caspases iniciadoras é necessário que haja um suporte proteico de ativação, o inflamassoma. A formação deste complexo tem como produto a indução de produção de citocinas inflamatórias e recrutamento de unidades celulares de resposta imunológica e reparo tecidual (DAVIS et al., 2011; STROWIG et al., 2012).

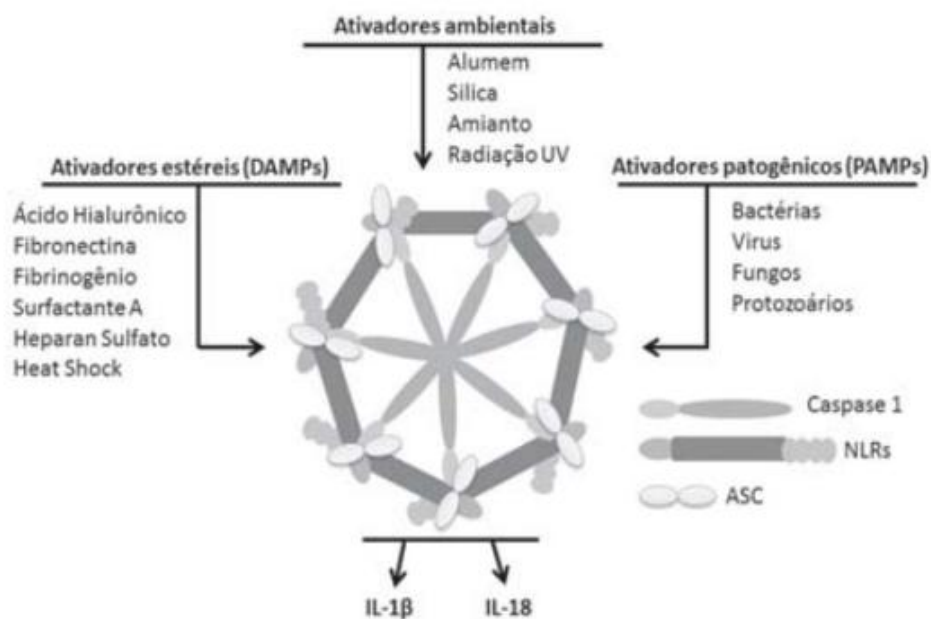
Já a IL-1, compreende uma família de proteínas que estão intimamente presentes durante alguns processos fisiológicos, como regulação do sono, temperatura corporal e



apetite, estando atuando durante diferentes doenças de caráter imunológico e inflamatório (BRADDOCK e QUINN, 2004). Essa é a primeira citocina ativada por atuação do complexo molecular inflamassoma e age principalmente através de interação com o receptor celular RI, o que culmina na ativação celular via mediadores intracelulares de sinalização (DINARELLO, 2008).

Muitos fatores PAMPs ou DAMPs podem conduzir à ativação do inflamassoma e formação do complexo proteico molecular (figura 6). Exemplos de PAMPs incluem o lipopolissacarídeo (LPS), peptídioglicano, e ácidos nucleicos. Já quanto a DAMPs pode-se incluir o ácido hialurônico, a fibronectina e fatores indicadores de dano teidual, sendo o reconhecimento destas últimas um importante sinalizador de diferenciação entre agentes patogênicos ou comensais. Fatores ambientais, em algumas situações, também podem atuar como potenciais ativadores da inflamação, como a sílica e a radiação ultravioleta (UV) (SIDIROPOULOS et al., 2008; PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012).

**Figura 6** - Ilustração esquemática de possíveis agentes ativadores da formação do complexo proteico inflamassoma, incluindo PAMPs, DAMPs e fatores ambientais.



Fonte: adaptado de Paiva-Oliveira e colaboradores (2012).

No organismo, a presença de PAMPs ou DAMPs é reconhecida através de receptores do tipo *Toll* (TLR). Vários tipos celulares possuem receptores TLR, incluindo células epiteliais, musculares, endoteliais e leucócitos. Nos leucócitos, a interação do agente PAMP ou DAMP com receptores TLR, ativa fatores de transcrição, como o NFκB e o IRF-3, consequentemente ativando a cascada inflamatória via produção de citocinas pró-

inflamatórias, iniciando pelas citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (tabela 1), moléculas de adesão e coestimuladoras (KAWAI e AKIRA, 2010).

**Tabela 2** - descrição das funções biológicas desempenhadas pela IL-1 $\beta$  e IL-18.

Citocina	Função biológica
IL-1 $\beta$	Estimula a produção de COX-2 e NO, induzindo a vasodilatação; Aumenta a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ e IL-6; Ativa células endoteliais; Aumenta produção de moléculas de adesão; Inibe a síntese de proteoglicanas; Estimula a hematopoese; Ativa linfócitos T e macrófagos.
IL-18	Estimula a proliferação de células T ativas; Aumenta a toxicidade de células NK; Induz a adesão de moléculas em superfícies; Aumenta os níveis de fator de crescimento de macrófagos (GM-CSF); Induz resposta de hipersensibilidade.

Fonte: adaptado de Paiva-Oliveira e colaboradores (2012).

Em relação ao inflamassoma NLRP3, este é constituído pela ASC, que possui um domínio de pirina (PYD), e a proteína NLR que possui outro domínio PYD. Quando ativado, os domínios PYD se ligam e a porção CARB da ASC se liga a pró-caspase 1 (forma inativa). Dessa maneira há a ativação da caspase 1 via clivagem. A forma ativa da caspase 1 atua clivando a pró-IL-1 $\beta$  e a pró-IL-18 tornando-as ativa através da obtenção da conformação madura de tais proteínas (TSCHOPP e SCHRODER, 2010; HANAMSAGAR et al., 2012). Quando o inflamassoma NLRP3 é inativo, este permanece no citoplasma celular com seu domínio de ligação central ligado a leucina, impedindo a oligomerização (TSCHOPP e SCHRODER, 2010). Todavia, ao receber um sinal de estímulo este complexo molecular migra para a mitocôndria e para o retículo endoplasmático associado à mitocôndria. Essa característica funcional foi demonstrada a partir da utilização de uma sonda fluorescente de marcação específica para mitocôndrias celulares.

Segundo Matzinger (2002) o inflamassoma funciona como um modelo de recepção de sinal de perigo, sendo o ATP um dos principais sinais de dano tecidual. Este conceito de ativação e intensificação da inflamação via inflamassoma, pode ser encontrada no choque séptico e artrite reumatoide (GONG et al., 2015), como também em doenças que apresentam a presença de ativação inflamatória crônica, como por exemplo, o diabetes (QIU e TANG.,

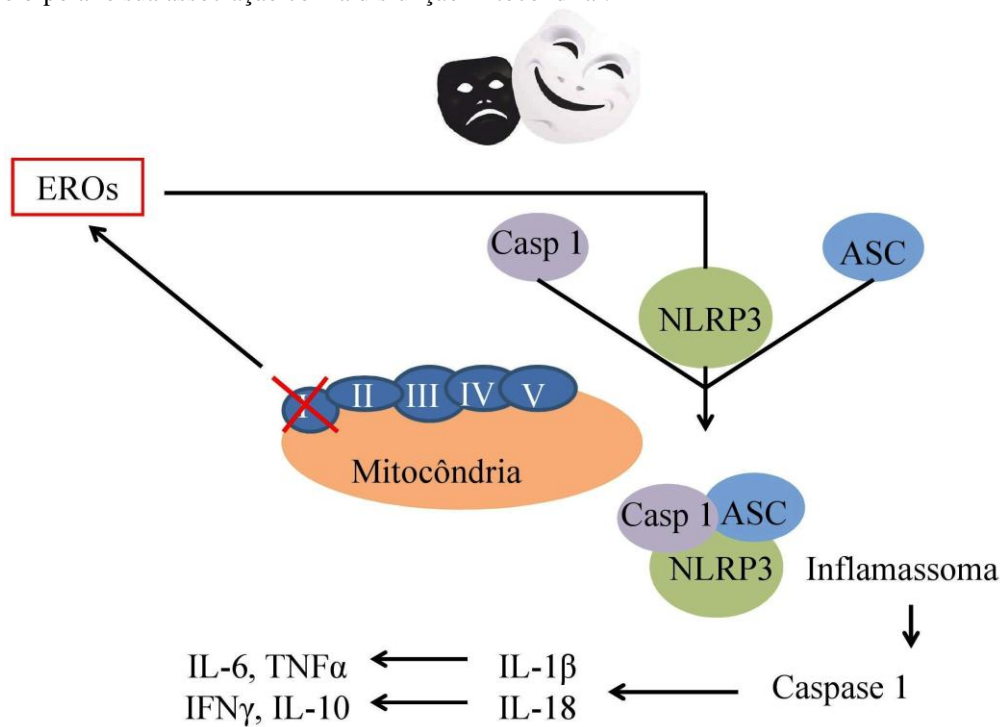
2016), cardiopatias (ZHAO et al., 2016) e doenças neuropsiquiátricas, incluindo a esquizofrenia e o transtorno bipolar (KIM et al., 2015; KIM et al., 2016).

O inflamassoma NLRP3 tem sido descrito como um sensor redox no sistema inflamatório, sendo então um potencial agente de ligação entre o metabolismo oxidativo celular e a ativação inflamatória (TSCHOPP e SCHRODER, 2010; ZHOU et al., 2011). Pesquisas recentes têm descrito a existência de uma correlação entre o estresse oxidativo e a ativação inflamatória através deste inflamassoma (KIM et al., 2016). No estudo desenvolvido por Zhou e colaboradores (2011), por exemplo, onde monócitos foram estimulados com 10  $\mu$ M de rotenona, um agente químico capaz de causar disfunção mitocondrial especificamente no complexo mitocondrial I da cadeia de transporte de elétrons, observou-se um aumento significativo da produção de EROs, com consequente dano mitocondrial e indução da formação do complexo proteico molecular do inflamassoma NLRP3. Além disso, nesse estudo foi demonstrado que a liberação excessiva de EROs atua como um agente sinalizador, de forma que a proteína NLRP3 se aproxima dos sítios de dano mitocondrial e se torna ativa via oligomerização. Ainda no estudo de Zhou e colaboradores (2011) foi avaliada a associação entre a formação do complexo retículo endoplasmático-mitocôndria. Esse complexo é de importância fisiológica na transferência de lipídeos e cálcio provenientes do retículo endoplasmático para a mitocôndria. Nesse sentido, monócitos foram expostos à MSU, o qual é um indutor de produção mitocondrial de EROs, e à nigericina, um antibiótico derivado de *Streptomyces hygroscopicus* que causa inibição do complexo de golgi e compromete a cadeia de transporte de elétron mitocondrial (reduz a produção de ATP) em células eucariotas. Com avaliação de microscopia eletrônica, foi observado que células não tratadas apresentaram a proteína NLRP3 e a ASC localizadas no citoplasma celular, enquanto que sob a exposição a ambos os agentes indutores houve aumento na produção de EROs e consequente aproximação da proteína NLRP3 ao complexo retículo endoplasmático-mitocôndria, tornando-o ativa, de forma a recrutar a proteína ASC. Ademais, quando tais células foram expostas ao inibidor de EROs, denominado pirrolidina ditiocarbamato de amônio, a montagem do inflamassoma NLRP3 foi completamente bloqueada. Logo, os autores comprovaram a característica de sensor redox que o inflamassoma NLRP3 possui frente ao desbalanço oxidativo.

Como já mencionado anteriormente, muitas doenças apresentam desbalanço oxidativo celular e ativação inflamatória crônica de forma concomitante (DONG et al., 2016; TSENG et al., 2016). Neste espectro, está incluído também o transtorno bipolar (KIM et al., 2015; KIM et al., 2016). Com o objetivo de elucidar se a ativação inflamatória crônica em indivíduos com

transtorno bipolar é dependente do estresse oxidativo via modulação do inflamassoma NLRP3, Kim e colaboradores (2016) desenvolveram um estudo utilizando amostras pós-morte de córtex frontal de sujeitos com transtorno bipolar. Quando comparados às amostras do grupo controle, foi observado que os indivíduos com transtorno bipolar apresentam disfunção mitocondrial no complexo I, por redução da expressão proteica da subunidade NDUF57, bem como níveis aumentados das proteínas NLRP3 e ASC e característica ativação inflamatória por produção aumentada da caspase 1 e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os autores destacam que tais achados são, sugestivamente, específicos de indivíduos com transtorno bipolar, pois amostras também pós-morte de córtex frontal de sujeitos com esquizofria não apresentaram o mesmo perfil de resultados, sendo provável que a ativação inflamatória nesses últimos aconteça através de outras rotas de sinalização imunológica. Logo, indivíduos com transtorno bipolar parecem ser particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo pela disfunção mitocondrial no complexo I e este fator funciona como potencial via de ativação inflamatória crônica em tais indivíduos através do complexo proteico NLRP3 (figura 7).

**Figura 7** - Ilustração esquemática da oligomerização e formação do inflamassoma NLRP3 em indivíduos com transtorno bipolar e sua associação com a disfunção mitocondrial.



Fonte: o próprio autor.

## 1.5 TERAPIA FARMACOLÓGICA NO TRANSTORNO BIPOLAR

Infelizmente, muitas doenças mentais não possuem terapia farmacológica específica, mas sim terapias que apenas controlam os sintomas da doença. Segundo a OMS (2015), existe uma considerável diferença entre as necessidades de tratamento e disponibilidade dos mesmos pelos sistemas de saúde. Em países considerados de média e baixa renda, 76%-85% dos acometidos por transtornos mentais não fazem uso do tratamento adequado.

Esta realidade também afeta pacientes com transtorno bipolar. As oscilações de humor decorrentes do transtorno bipolar que acometem 3% da população mundial é uma condição severa e que não possui total entendimento quanto a aspectos etiológicos e fisiopatológicos, o que por vez acaba dificultando a terapia farmacológica e o desenvolvimento de novos medicamentos (PERÄLÄ et al., 2007; JUDD et al., 2008; EMSLEY et al., 2013). A terapia farmacológica atual empregada no tratamento do transtorno bipolar é basicamente composta pelo uso de estabilizadores do humor, incluindo, por exemplo, o valproato, a carbamazepina, a lamotrigina e o lítio. Além disso, o uso de antipsicóticos de segunda geração, ou atípicos, também pode ser uma alternativa de tratamento, como, por exemplo, a risperidona (GOODWIN, 2009; GRUNZE et al., 2010; CURRAN e RAVINDRAN, 2014).

O estabilizador de humor valproato ou ácido valpróico é um fármaco usado no tratamento do transtorno bipolar, epilepsia e enxaqueca. Este ácido graxo de cadeia ramificada atua aumentando os níveis do neurotransmissor inibidor ácido gama-aminobutírico (GABA). Todavia, a atividade molecular do valproato no tratamento do transtorno bipolar ainda não está bem determinada. Porém, estudos experimentais sugerem que este medicamento atue através de modificações na expressão de genes neuroprotetores (JOHANNESSEN, 2000; JOHANNESSEN e JOHANNESSEN, 2003; ROSENBERG, 2007).

Portanto, o valproato tem ação farmacogenômica, e alguns exemplos de genes importantes a nível neuronal que o valproato apresenta influência em indivíduos com transtorno bipolar são o ativador da proteína 1 (AP-1), reduzindo-o, o qual é um importante fator de transcrição, e a desacetilase de histonas (HDAC) (KAKIUCHI et al., 2009). Entretanto, este medicamento pode conduzir a alguns efeitos colaterais, tais como desconforto gastrointestinal, sedação, tremor e aumento do peso corporal (GRUNZE et al., 2010).

Já a carbamazepina é outro fármaco que também pode ser utilizado no tratamento de epilepsia e transtorno bipolar. Este fármaco é aprovado pela “U.S. Food and Drug Administration for the Treatment of Bipolar Disorder manic or mixed episodes in adults” e também pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde do

Brasil. A carbamazepina atua como bloqueador dos canais de sódio das membranas dos neurônios, reduzindo o potencial de ação. Porém, a carbamazepina também pode causar efeitos colaterais indesejados ao tratamento de indivíduos com transtorno bipolar, incluindo reação alérgica, visão turva e sedação (SCHNEIDER et al., 2014).

A risperidona é um antipsicótico atípico que está cada vez mais sendo usado como alternativa para tratamento de doenças psiquiátricas, principalmente esquizofrenia e episódios maníacos associados ao transtorno bipolar. Além disso, a risperidona pode ser usada no tratamento de crianças e adolescentes com desordens de conduta, com comportamento agressivo persistente e para indivíduos com doença de Alzheimer moderada ou severa (HEYKANTS et al., 1994). A absorção oral deste fármaco é de 70% (biodisponibilidade) e a biotransformação hepática é que origina o metabólito ativo 9-hidroxisperidona. A sua meia vida no plasma é de 3 a 20 horas, sendo excretada pelos rins através da urina. O metabólito ativo atua como um antagonista seletivo monoaminérgico, possuindo alta afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 2 (5-HT<sub>2</sub>) e afinidade relativa pelos receptores dopaminérgicos do tipo 2 (D<sub>2</sub>). No SNC a risperidona funciona como um potente bloqueador da dopamina através da inibição do funcionamento dos seus receptores. Provavelmente o efeito antipsicótico da risperidona está relacionado a este antagonismo seletivo. A risperidona também pode bloquear receptores alfa 2-adrenérgicos e histaminérgicos H<sub>1</sub> (HEYKANTS et al., 1994; RAMOS et al., 2006).

Todavia, apesar de seus efeitos benéficos, a risperidona também pode conduzir o indivíduo a alguns efeitos indesejáveis importantes como, sintomas extrapiramidais, tonturas, náuseas, distúrbios no sono (insônia/sonolência), constipação, hipotensão, dor abdominal, rinite, diminuição no desejo sexual, taquicardia entre outros (LLERENA et al., 2013). Adicionalmente, este fármaco pode aumentar o risco ao desenvolvimento de síndrome metabólica (RIEDEL et al., 2005). No estudo conduzido por Bóden e colaboradores (2013) a prevalência de pacientes tratados com risperidona que apresentaram síndrome metabólica foi de 42%, ficando acima de outros antipsicóticos avaliados, como o aripiprazole (35%) e o flupentixol (39%).

Por outro lado, o lítio é o estabilizador do humor mais convencional utilizado no tratamento do transtorno bipolar, porém, assim como os demais estabilizadores do humor, não atua via metabolismo oxidativo-inflamatório de forma concomitante. Este fármaco, apesar do seu uso comum na clínica psiquiátrica, apresenta algumas limitações quanto à detecção da concentração efetiva e não tóxica ao indivíduo doente (*National Collaborating Centre of Mental Health*, 2006). Em 40 – 80% das situações de tratamento os pacientes apresentam

resposta positiva, sendo este fármaco vinculado a uma significativa redução dos índices de suicídio na população acometida por doenças neuropsiquiátricas (CIPRIANI et al., 2005; VIETA et al., 2008).

Molecularmente, o lítio atua em diferentes vias celulares em indivíduos com transtorno bipolar. Uma das vias é através do sinalizador Wnt, o qual é um complexo formado por diferentes proteínas que passam sinais extracelulares para o meio intracelular. Outro modo de atuação do lítio é através da inibição da glicogênio sintase quinase  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ), como também através da regulação dos níveis de fluxo de cálcio (BOYADJIEVA e VARADINOVA, 2012; MALHI et al., 2013). Em adição, o lítio parece também atuar diretamente na mitocôndria. Em estudo desenvolvido por Hou e colaboradores (2015), foi observado que o lítio é capaz de proteger células dopaminérgicas contra o efeito citotóxico da rotenona, um inibidor da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, conservando a viabilidade celular e evitando o acúmulo de EROs intracelular, principalmente através do processo de autofagia mitocondrial, o qual é um processo mitocondrial de degradação que garante a reposição mitocondrial e que está intimamente relacionado com a homeostase celular (LEMASTERS, 2005). Porém, a detecção da dose efetiva e não tóxica é de difícil realização, o que por vez faz com que haja a necessidade de monitoramento da concentração plasmáticas de lítio de maneira periódica, como também, o uso de longa duração do lítio pode conduzir o paciente a efeitos colaterais negativos, tais como hipotireoidismo, disfunção renal e desordens de memória, que por vez acabam, em muitos casos, reduzindo a assiduidade do indivíduo ao tratamento farmacológico, fato este de extrema importância já que cerca de 50% dos indivíduos interrompem o tratamento pelo menos uma vez e o suicídio é uma das consequências para muitos desses sujeitos (KLEINER et al., 1999; MARKOWITZ et al., 2000; YOUNG e NEWHAM, 2006).

Apesar dos estabilizadores de humor serem a opção atual para o tratamento do transtorno bipolar, existem algumas limitações na eficácia farmacológica dos mesmos, além dos efeitos colaterais, que podem comprometer a melhora do indivíduo acometido por esta patologia mental. Em muitos casos, pacientes tratados durante longo prazo com estabilizadores do humor podem apresentar tolerância farmacológica, caracterizada pela recorrência dos episódios de mania e depressão (KOUKOPOULOS et al., 1995; POST e LEVERICH, 2008). Além disso, geralmente os primeiros sintomas da doença iniciam durante a adolescência, e estudos epidemiológicos relatam que apenas 50% dos jovens são diagnosticados corretamente e respondem positivamente ao tratamento medicamentoso administrado (CORRELL et al., 2010). Dessa forma a busca pelo desenvolvimento de novas

alternativas farmacológicas como potenciais agentes terapêuticos do transtorno bipolar, baseado em biomarcadores descritos recentemente, se faz de grande necessidade e validade.

## 1.6 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAIS EFEITOS FARMACOLÓGICOS

Atualmente muitos têm sido os estudos desenvolvidos utilizando extratos de produtos naturais como frutos e vegetais (SOUZA-FILHO et al., 2013; JOBIM et al. 2014; MOSTARDEIRO et al., 2014; SAGRILLO et al., 2015; MACHADO et al., 2015). Especialmente no Brasil, tais pesquisas baseam-se no fato da grande biodiversidade vegetal encontrada principalmente na Amazônia e que tais produtos necessitam de maiores explorações e caracterização (SANTOS et al., 2015). Já se é sabido que boas práticas alimentares, através do consumo diário de uma dieta adequada e rica em frutos e vegetais, podem possuir um grande número de efeitos benéficos à saúde humana, devido especialmente aos efeitos antioxidante, anti-inflamatório, analgésico e antitumoral de vários desses alimentos (COLD, 1986; PRIOR e CAO, 2000). Tais atividades se devem pela presença de inúmeras substâncias bioativas que podem ser encontradas nesses alimentos funcionais, como por exemplo, polifenóis, dentre outros (PRIOR e CAO, 2000).

Um exemplo de alimento funcional que vem sendo bastante explorado no meio científico é a *Paullinia cupana*, conhecida popularmente como guaraná. O guaraná é um fruto de importância econômica e comercial nacional (KUSKOSKI et al., 2005; SCHIMPL et al., 2013) e que apresenta em sua composição química consideráveis concentrações de alcalóides, como teofilina, cafeína, teobromina, bem como terpenos, flavonoides e amidas. Além disso, o guaraná é considerado o fruto mais rico em cafeína do mundo, apresentando concentrações de cafeína três vezes superiores ao café (ALBUQUERQUE., 1991; BYDLOWSKI et al., 1991; ESPINOLA et al., 1997; EDWARDS et al., 2005; HOWELL et al., 2005). Pesquisas experimentais com este fruto demonstraram vários potenciais efeitos biológicos, como antioxidante, antiplaquetário, anti-inflamatório, antitumoral, antiobesogênico e bactericida (SMITH e ATROCH, 2010; SCHIMPL et al., 2013; CADONÁ et al., 2016). No estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2015), por exemplo, foi evidenciado que o extrato hidroalcoólico de guaraná é capaz de reverter a senescência celular de células tronco mesenquimais através da normalização do sistema oxidativo celular atuando também a nível de expressão gênica. Além disso, em estudo realizado por Costa Krewer e colaboradores (2011) foi demonstrado que o consumo diário de pó de guaraná por idosos ribeirinhos do Amazonas tem relação com a menor prevalência de algumas doenças crônicas



associadas ao envelhecimento, como diabetes e hipertensão, evidenciando o potencial farmacológico deste fruto.

Outro fruto muito consumido na região amazônica é o *Astrocaryum aculeatum*, conhecido popularmente como tucumã. O tucumã também apresenta uma grande variedade de moléculas bioativas em sua composição química, incluindo principalmente carotenóides (SAGRILLO et al., 2015; SOUZA-FILHO et al., 2013). No estudo experimental aplicado por Jobim e colaboradores (2014) foi observado que o extrato de tucumã possui considerável atividade farmacológica antibacteriana, contra bactérias Gram-positivas, e antifúngica, contra *Candida albicans*. Assim como, SAGRILLO e colaboradores (2015) demonstraram a atividade citoprotetora do extrato de tucumã em linfócitos humanos expostos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Existem também alguns produtos naturais com potenciais atividades neuroprotetoras, como, por exemplo, a *Vitis labrusca*, chamado popularmente de uva. Até mesmo o extrato preparado a partir dos descartes de uva, não utilizados na produção de vinho, apresentam atividades bioativas. Este tipo de extrato além de antioxidante atua de forma neuroprotetora através da regulação dos níveis de cálcio e normalização morfológica celular (SCOLA et al., 2014). Outro forte candidato aos estudos de neuroproteção é a espécie *Euterpe oleracea*, o qual é popularmente denominada açaí. O açaí é um fruto nativo da Amazônia brasileira que possui consideráveis concentrações de moléculas bioativas como parte de sua matriz química e uma variedade de fitoquímicos, incluindo polifenóis, especialmente antocioninas. As antocianinas são capazes de reduzir o estresse oxidativo e conduzir as células a homeostase oxidativa. Estudos com o extrato de açaí em células do córtex cerebral com indução ao estresse oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostraram uma redução dos danos celulares nas células tratadas com o extrato do fruto. Além disso, pesquisa desenvolvida com humanos que consumiam suco de açaí diariamente, revelou que o fruto possui considerável atividade anti-inflamatória e apresenta efeito na percepção da dor (SPADA et al., 2009; JENSEN et al., 2011; POULOSE et al., 2012).

Dessa forma, o interesse pelo estudo de produtos naturais e alimentos funcionais vem ganhando grande destaque quanto aos alvos e mecanismos de ação, metabolismo celular, e potenciais efeitos benéficos que possam suportar a pesquisa pelo desenvolvimento de novos fármacos, baseando-se também em biomarcadores específicos e novos alvos terapêuticos.

## 1.7 POTENCIAL AÇÃO NEUROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ)

O açaí é o fruto de uma palmeira muito difundida nas áreas de planície e de inundações da região amazônica, pertencente à família *Arecaceae* (MUÑIZ-MIRET et al., 1996). Estas palmeiras apresentam em média 20-30 metros de altura (JANICK E PAUL, 2008), com múltiplas hastes, as quais suportam em torno de 3 a 8 cachos de frutos, sendo que cada cacho pode apresentar até 900 frutos de açaí (CAMPOS et al., 1991) (Figura 8A). Os frutos de açaí são de cor roxa a preta e de tamanho pequeno, possuindo em torno de 1-1,5 cm de diâmetro. Além da pequena quantidade de polpa, o açaí contém uma semente que corresponde a cerca de 85% do tamanho do fruto (STRUDWICK e SOBEL, 1988; PESSOA e da SILVA e SILVA, 2007) (figura 8B).

Este fruto é comumente consumido pela população da região amazônica, principalmente por habitantes indígenas e da zona rural (GOULDING e SMITH, 2007). Tais indivíduos atribuem vários efeitos fitoterápicos ao açaí, como por exemplo, efeitos contra problemas gastrointestinais e de disfunções de coagulação, utilizando não somente o fruto, mas também a casca do tronco e folhas da palmeira (MATHEUS et al., 2007). Atualmente, a comercialização do açaí tem avançado muito, já que este fruto vem sendo usado na produção de diversos produtos de consumo alimentar, como bebidas e alimentos a base de açaí, tanto a nível nacional quanto internacional (COISSON et al., 2005; JANICK e PAUL, 2008; SILVA, 2008).

**Figura 8** - Ilustrações da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). (A) Palmeira com cachos contendo o fruto; (B) frutos maduros de açaí colhidos.



Vários estudos recentes vêm demonstrando os efeitos biológicos positivos do açaí. Devido principalmente a composição química deste fruto é que muitos efeitos biativos são observados. Em um estudo *in vivo* desenvolvido por Spada e colaboradores (2009) com ratos expostos ao agente oxidante  $H_2O_2$ , foi demonstrado o efeito citoprotetor do extrato de açaí em células do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, via atividade antioxidante. Essa atividade foi também descrita por Barbosa e colaboradores (2016), os quais estudaram o consumo diário de polpa de açaí por humanos e observaram uma significativa redução na produção de EROs nos indivíduos que bebiam o suco do fruto, assim como significativo aumento da capacidade antioxidante total, principalmente da enzima antioxidante CAT e redução dos níveis de carbonilação proteica, quando comparado ao grupo que não fazia consumo diário do fruto, provando assim o potencial efeito antioxidante deste fruto. Em virtude de sua atividade antioxidante, o consumo de açaí tem sido associado a menores riscos de aparecimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como o risco de doenças cardíacas, por exemplo. Rocha e colaboradores (2007) reportaram efeito vasodilatador de extrato de açaí em ratos. Já Xie e colaboradores (2012) descreveram que o consumo rotineiro de suco de açaí reduz os riscos de aterosclerose. Além disso, o açaí apresenta efeito preventivo contra cardiotoxicidade e genotoxicidade, de forma a atenuar possíveis danos ao DNA causados por EROs. Na investigação de Ribeiro e colaboradores (2010), o extrato de açaí foi capaz de reduzir o índice de dano ao DNA causado pelo agente estressor cloridrato de doxorrubicina (DXR), um fármaco quimioterápico amplamente utilizado.

Adicionalmente, existem relatos de que o açaí possui atividade antitumoral e até mesmo anti-inflamatória (KANG et al., 2011; NORATTO et al., 2011; DIAS et al., 2015). O efeito antitumoral ocorre através da ativação de vias pró-apoptóticas mitocondriais e supressão de oncogenes (DIAS et al., 2014), como também através da formação de vacúolos autofágicos celulares induzidas pela superexpressão de genes vinculados a formação de autofagossomos (SILVA et al., 2014). As descrições iniciais quanto à atividade anti-inflamatória do açaí foram realizadas a partir de relatos não científicos por parte da população que fazia consumo desse fruto por seu efeito contra a inflamação e também contra malária, o que mais tarde foi comprovado por estudos experimentais (BOURDY et al., 2000; RUIZ et al., 2011). Matheus e colaboradores (2006) através de um estudo *in vitro* demonstraram a capacidade anti-inflamatória do açaí em células RAW 264.7 expostas ao indutor LPS e ao IFN- $\gamma$ , via redução da produção de NO e diminuição da proliferação celular. Perfil semelhante foi também descrito por Kang e colaboradores (2012), onde o extrato de açaí apresentou efeito anti-inflamatório em células induzidas com LPS. Já na pesquisa de Poulouse e

colaboradores (2012), o extrato de açaí mostrou-se capaz de proteger células BV-2 da micróglia contra a exposição prévia ao LPS, reduzindo a produção de NO, bem como os níveis de ciclooxigenase-2 (COX-2), do TNF- $\alpha$  e do fator NF $\kappa$ B. Além disso, segundo Ford e colaboradores (2016), polifenóis presentes no açaí são capazes de reduzir os níveis de mediadores pró-inflamatórios em linfócitos humanos, o que por vez sugere que o açaí pode ser uma potencial alternativa contra a ativação inflamatória crônica. Todavia, os mecanismos celulares na cascata inflamatória pelos quais o açaí desempenha sua atividade anti-inflamatória ainda não estão totalmente elucidados.

Adicionalmente, o açaí apresenta atividade neuromoduladora. No estudo de Wong e colaboradores (2013), utilizando modelo experimental para doença de Alzheimer, descreveram um efeito neuroprotetor do extrato de açaí em células PC12. Neste estudo, o extrato de açaí protegeu as células contra a exposição a  $\beta$ -amilóide1.42, aumentando a viabilidade celular para níveis similares às células controle, bem como inibindo a formação de fibrilas e agregados amilóides. Recentemente, Souza-Monteiro e colaboradores (2015) relataram a eficácia do suco de açaí na diminuição de convulsão induzida por pentilenotetrazol em ratos. O suco de açaí diminuiu a duração das convulsões bem como aumentou o tempo para a ocorrência da primeira contração mioclônica e primeira convulsão tônico-clônica, além de prevenir significativamente a lipoperoxidação na região do córtex cerebral. Dessa forma, sugere-se que o açaí pode apresentar relevantes atividades protetoras ao organismo, incluindo efeitos de neuroproteção. Todavia, ainda não há estudos que investiguem o potencial efeito do açaí sob condições semelhantes à encontrada em indivíduos com transtorno bipolar a nível celular neuronal, como, por exemplo, sob disfunção no complexo mitocondrial I.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* as propriedades neurofarmacológicas do extrato hidroalcoólico da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na modulação da disfunção mitocondrial do complexo NADH - coenzima Q oxiredutase (complexo mitocondrial I), estresse oxidativo e metabolismo inflamatório via inflamassoma NLRP3.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Revisar a literatura corrente sobre a associação entre disfunção mitocondrial e doenças neuropsiquiátricas com destaque ao transtorno bipolar;

Produzir e caracterizar quimicamente um extrato hidroalcoólico de açaí;

Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de açaí na disfunção mitocondrial causada pela exposição à rotenona de células da linhagem comercial de neuroblastoma (SH-SY5Y) através da análise do efeito:

- na viabilidade celular;
- na fosforilação oxidativa de todos os complexos mitocondriais da cadeia de transporte de elétrons;
- na atividade enzimática do complexo mitocondrial NADH - coenzima Q oxiredutase (complexo mitocondrial I);
- na expressão proteica e gênica de subunidades do complexo mitocondrial NADH – coenzima Q oxiredutase (complexo mitocondrial I): NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 e NDUFV2;
- nos parâmetros do metabolismo oxidativo: níveis celulares totais de EROs e peroxidação lipídica;

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de açaí na linhagem comercial de macrófagos (RAW 264.7) induzidos à inflamação com fitohemaglutinina (PHA), através da análise:

- da viabilidade e proliferação celular;
- dos parâmetros relacionados ao metabolismo oxidativo: níveis celulares totais de EROs e produção de NO;
- da modulação do ciclo de divisão celular;
- da expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ ; e anti-inflamatória: IL-10;
- da expressão proteica da proteína de ativação intrínseca da apoptose e inflamatória, caspase 1;
- da expressão proteica do inflamassoma NLRP3.

### 3 RESULTADOS

Os resultados, bem como os métodos utilizados, referentes a esta tese de doutorado estão organizados sob a forma de três manuscritos científicos. O primeiro contempla a produção do artigo de revisão literária sobre novos biomarcadores associados à doenças psiquiátricas, em especial ao transtorno bipolar, o qual já está publicado. O segundo contempla a análise do potencial farmacológico do açaí em neurônios com disfunção mitocondrial induzida por rotenona, o qual também já está publicado em revista científica. O terceiro manuscrito refere-se à avaliação da capacidade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de açaí em macrófagos RAW 264.7 induzidos a inflamação com fitohemaglutinina (PHA), tal manuscrito encontra-se submetido em revista científica.

#### **Manuscrito 1**

**Título:** *Upstream Pathways Controlling Mitochondrial Function in Major Psychosis: A Focus on Bipolar Disorder.*

**Autores:** Alencar Kolinski Machado; Alexander Yongshuai Pan; Tatiane Morgana da Silva; Angela Duong; Ana Cristina Andreazza.

**Revista:** *Canadian Journal of Psychiatry/ Le Revue Canadienne de Psychiatrie* (fator de impacto = 2,952).

**Situação:** publicado.

#### **Manuscrito 2**

**Título:** *Neuroprotective Effects of Açaí (Euterpe oleracea Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure.*

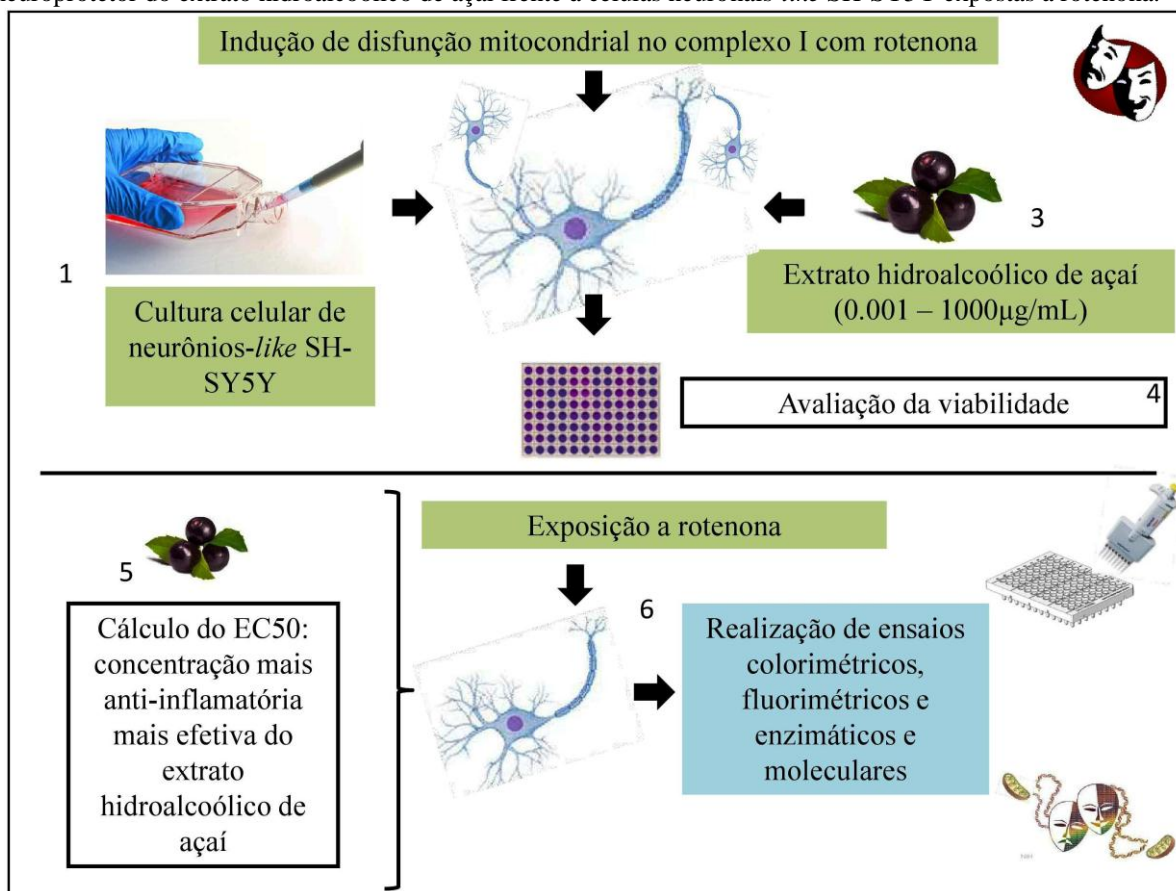
**Autores:** Alencar Kolinski Machado; Ana Cristina Andreazza; Tatiane Morgana da Silva; Aline Augusti Boligon; Vanusa do Nascimento; Gustavo Scola; Angela Duong; Francine Carla Codaná; Euler Esteves Ribeiro; Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Revista:** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (fator de impacto = 4,492).

**Situação:** publicado.

### Desenho experimental referente ao manuscrito 2:

**Figura 9** - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais desenvolvidos para avaliação do efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de açaí frente à células neuronais-like SH-SY5Y expostas a rotenona.



Fonte: o próprio autor.

### Manuscrito 3

**Título:** *Anti-inflammatory potential of açaí (Euterpe oleracea Mart.) via NLRP3 modulation in PHA-induced RAW 264.7 macrophages.*

**Autores:** Alencar Kolinski Machado; Francine Carla Cadoná; Charles Elias Assmann; Ana Cristina Andreazza; Marta Maria Medeiros Frescura Duarte; Thiago Duarte; Euler Esteves Ribeiro; Xiao-Yan Wen; Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

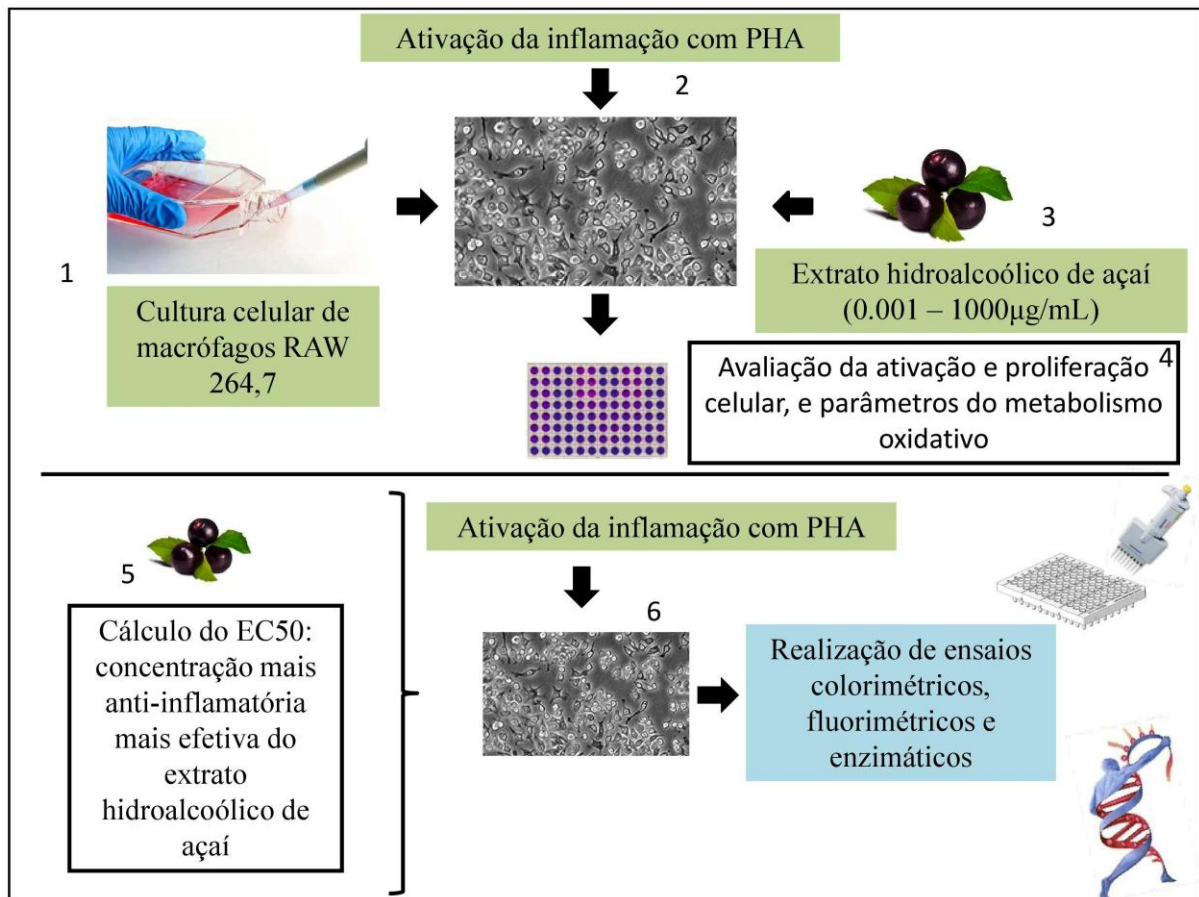


**Revista:** *Inflammation Research* (fator de impacto = 2,557).

**Situação:** em fase de submissão.

**Desenho experimental referente ao manuscrito 3:**

**Figura 10** - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais desenvolvidos para avaliação da capacidade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de açaí frente à macrófagos RAW 264,7 ativados com PHA.



Fonte: o próprio autor.



**Manuscript 1**

Upstream Pathways Controlling Mitochondrial Function in Major Psychosis: A Focus on  
Bipolar Disorder







# Upstream Pathways Controlling Mitochondrial Function in Major Psychosis: A Focus on Bipolar Disorder

Les trajectoires en amont contrôlant la fonction mitochondriale dans la psychose majeure : regard sur le trouble bipolaire

Alencar Kolinski Machado, MSc<sup>1,2,\*</sup>, Alexander Yongshuai Pan, BSc<sup>1,\*</sup>, Tatiane Morgana da Silva, BSc<sup>1,3</sup>, Angela Duong, BSc<sup>1</sup>, and Ana Cristina Andreazza, Pharm, PhD<sup>1,4,5</sup>

The Canadian Journal of Psychiatry /  
La Revue Canadienne de Psychiatrie  
2016, Vol. 61(8) 446-456  
© The Author(s) 2016  
Reprints and permission:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0706743716648297  
TheCJP.ca | LaRCP.ca

## Abstract

Mitochondrial dysfunction is commonly observed in bipolar disorder (BD) and schizophrenia (SCZ) and may be a central feature of psychosis. These illnesses are complex and heterogeneous, which is reflected by the complexity of the processes regulating mitochondrial function. Mitochondria are typically associated with energy production; however, dysfunction of mitochondria affects not only energy production but also vital cellular processes, including the formation of reactive oxygen species, cell cycle and survival, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and neurotransmission. In this review, we characterize the upstream components controlling mitochondrial function, including 1) mutations in nuclear and mitochondrial DNA, 2) mitochondrial dynamics, and 3) intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. Characterizing and understanding the upstream factors that regulate mitochondrial function is essential to understand progression of these illnesses and develop biomarkers and therapeutics.

## Abrégé

La dysfonction mitochondriale est communément observée dans le trouble bipolaire (TB) et la schizophrénie (SCZ) et peut être un élément central de la psychose. Ces maladies sont complexes et hétérogènes, ce qui est reflété par la complexité des processus régulant la fonction mitochondriale. Les mitochondries sont typiquement associées à la production d'énergie; cependant, la dysfonction des mitochondries affecte non seulement la production d'énergie, mais aussi des processus cellulaires vitaux, y compris la formation des dérivés réactifs de l'oxygène, le cycle et la survie des cellules, l'homéostasie intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$ , et la neurotransmission. Dans cette revue, nous caractérisons les composantes en amont qui contrôlent la fonction mitochondriale, notamment (1) les mutations de l'ADN nucléaire et mitochondrial, (2) la dynamique mitochondriale, et (3) l'homéostasie intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$ . La caractérisation et la compréhension des facteurs en amont qui régulent la fonction mitochondriale sont essentielles pour comprendre la progression de ces maladies et mettre au point des biomarqueurs et des thérapeutiques.

## Keywords

psychosis, bipolar disorder, schizophrenia, mitochondria

## Highlights

- Mitochondrial dysfunction is frequently reported in both bipolar disorder (BD) and schizophrenia (SCZ).
- This may lead to increased generation of reactive oxygen species (ROS).
- ROS may react with cellular macromolecules to alter signaling pathways, decompensate myelin, and cause damage to DNA and RNA.

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, University of Toronto, Toronto, Ontario

<sup>2</sup> Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup> Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

<sup>4</sup> Department of Psychiatry, University of Toronto, Toronto, Ontario

<sup>5</sup> Centre for Addiction and Mental Health, Toronto, Ontario

\* Both authors contributed equally to this article.

## Corresponding Author:

Ana Cristina Andreazza, Pharm, PhD, 1 King's College Circle, Toronto, ON M5S 1A8, Canada.

Email: ana.andreazza@utoronto.ca

- Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA) may produce mitochondrial dysfunction in BD and SCZ.
- Disrupted mitochondrial fusion, fission, and trafficking may impair mitochondrial function in SCZ.
- Enhanced release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum in BD and SCZ may lead to mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload, disrupting function.

## Introduction

Bipolar disorder (BD) and schizophrenia (SCZ) are severe psychiatric disorders with a lifetime prevalence exceeding 3% of the population worldwide.<sup>1</sup> These disorders are characterized by clinical features such as mania and depression in BD or hallucinations and delusions in SCZ. Relapse and recurrent psychosis are common to both disorders, causing lifelong disease burden and impairment.<sup>2,3</sup> Understanding the etiology and pathophysiology of these disorders is necessary to develop biomarkers and rational therapeutics to ease their burden. Substantial evidence exists suggesting a role for mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of major psychoses.<sup>4-6</sup> Although mitochondria are traditionally associated with adenosine triphosphate (ATP) production, they are also crucial in regulating cell cycle,<sup>7</sup> death and survival,<sup>8</sup> intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis,<sup>9</sup> and neurotransmission.<sup>10</sup> The brain in particular is affected by dysfunction in mitochondria due to its high energy demands and sensitivity to oxidative damage.<sup>11</sup> Because neurotransmitter release and cell survival are dependent on ATP production and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, mitochondrial dysfunction can alter synaptic connectivity, which may in turn produce symptoms of psychosis.<sup>12,13</sup> Understanding mitochondrial function will be crucial to comprehend disease progression and to develop rational therapeutics to improve the quality of life of patients with psychiatric illness.

Three of the major upstream pathways that may impair mitochondrial function in BD and SCZ include 1) mutations in nuclear and mitochondrial DNA, 2) altered mitochondrial dynamics, and 3) perturbed  $\text{Ca}^{2+}$  flux. BD and SCZ are complex diseases that cannot be characterized by a singular narrow pathway. Rather, numerous subtle alterations likely converge upon particular pathways (i.e., mitochondrial function) to produce functional alterations. Thus, examining upstream pathways that control mitochondrial function will lead to a more comprehensive understanding of the etiology and pathophysiology of BD and SCZ. In this review, we will address how these interrelated upstream processes may contribute to mitochondrial dysfunction in major psychosis.

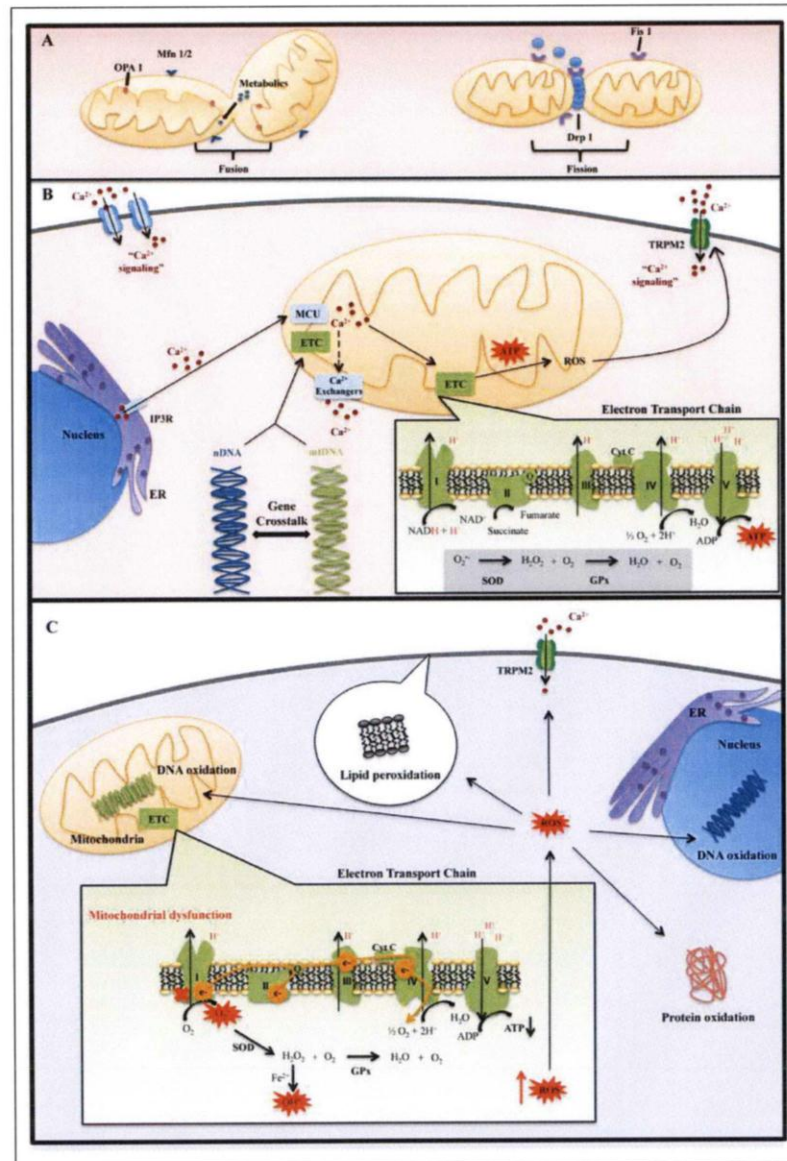
## Mitochondrial Dysfunction in Major Psychosis

Mitochondria are a major endogenous source of reactive oxygen species (ROS).<sup>14</sup> During normal mitochondrial

metabolism, only a small proportion of electrons escape the electron transport chain (ETC), mainly through complex I.<sup>15</sup> These electrons reduce  $\text{O}_2$  to produce superoxide anion, which is then dismutated by superoxide dismutase (SOD) to yield hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Figure 1B).<sup>16</sup> In the presence of reduced transition metals,  $\text{H}_2\text{O}_2$  may further react to form a hydroxyl radical.<sup>16</sup> Hydroxyl radicals are highly reactive and can oxidize nucleic acids, lipids, and proteins (Figure 1C).<sup>17,18</sup> ROS are strong oxidants and important signaling molecules, whose effects are balanced by antioxidants,<sup>19,20</sup> such as glutathione, SOD, and glutathione peroxidase (GPx).<sup>21</sup> Dysregulation of the ETC may lead to greater proportion of electrons escaping and forming ROS.<sup>22</sup> When ROS production exceeds the capacity of antioxidant networks, the cell is subjected to oxidative stress.<sup>15,18</sup> The brain in particular is susceptible to oxidative stress due to its high-energy demand, easily oxidized polyunsaturated fatty acids, and relatively low antioxidant capacity.<sup>23,24</sup> Compromised mitochondrial function can disrupt neuronal oxidative metabolism. This may alter neurotransmission and neuronal growth, 2 highly energy-dependent processes, producing symptoms of psychosis and altered mood.<sup>15,25</sup>

Complex I is the first structure of the ETC that catalyzes the transfer of electrons from NADH to ubiquinone<sup>26</sup> and is also the major site of ROS generation in the ETC.<sup>27,28</sup> Dysfunction of mitochondrial complex I is a commonly observed phenomenon in BD and SCZ. A recent review of microarray studies found a consistent downregulation of genes encoding subunits of complex I, including NDUFV1, NDUFS1, NDUFS8, and NDUFS7, in postmortem frontal cortex (PFC) and hippocampus samples of subjects with BD.<sup>4</sup> The subunits that were found to be downregulated in BD formed the catalytic core of complex I involved specifically in electron transfer from NADH to ubiquinone,<sup>29</sup> suggesting that patients with BD may be susceptible to electron leakage through complex I. In contrast, patients with SCZ presented with inconsistent alterations, which included increased and decreased gene expression levels of both structural and catalytic subunits.<sup>4</sup> In agreement with these findings, a previous study demonstrated decreased NDUFS7 protein levels in the PFC of subjects with BD but not SCZ, which were associated with decreased complex I activity.<sup>30</sup> Interestingly, the mood stabilizer  $\text{Li}^+$  was found to increase expression of complex I subunits in postmortem brains and activity level in vivo of subjects with BD.<sup>31,32</sup> These findings suggest that while complex I dysfunction is present in both disorders, impairments in electron transfer may be more specific to BD (Table 1).

A major consequence of complex I dysfunction is the generation of ROS, leading to oxidative damage to macromolecules. A number of studies have identified increased oxidative damage markers to protein, lipid, and DNA in BD and SCZ.<sup>30,33-38</sup> ROS-induced oxidative damage to lipids, for instance, results in lipid hydroperoxides (LPH), which are unstable and react with other lipids to form



**Figure 1.** (A) Mitochondrial dynamic: fusion process is important for mitochondrial function by diffusion of metabolites and enzymes between mitochondria, as well as dilution of damaged proteins and DNA. The fusion mediators are Mfn1 and Mfn2, which is present on the outer mitochondrial membrane, and Opa1, which is located in the inner mitochondrial membrane. Fission process can isolate injured mitochondria, contributing to mitochondrial quality control. The fission mediators are Fis1 and Drp1. Fis1 recruits Drp1 to mitochondria, and it permits the development of fission process. (B) Normal mitochondrial function: mitochondrial and electron transport chain (ETC) assembly and function are dependent on nuclear DNA (nDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded proteins. nDNA-encoded proteins regulate mitochondrial replication, transcription, and repair, allowing for crosstalk between nDNA and mtDNA. Mitochondria take up  $\text{Ca}^{2+}$  primarily through mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter (MCU).  $\text{Ca}^{2+}$  is then extruded from mitochondria through ion exchangers that are coupled to adenosine triphosphate (ATP) production. Mitochondria are localized close to sites of  $\text{Ca}^{2+}$  entry, such as the endoplasmic reticulum (ER) and membrane channels, allowing them to buffer cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. (C) Mitochondrial dysfunction: ETC impairment increases the amount of electrons leakage, resulting in increased reactive oxygen species (ROS) production. High levels of ROS coupled with low antioxidant defenses disrupt redox homeostasis, leading to cellular oxidative stress. Antioxidant defenses include superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). If these high levels of ROS are not sufficiently detoxified by these antioxidant enzymes, it can cause oxidative damage to proteins, lipids, and nucleic acids.

**Table 1.** Summary of Pertinent Findings Discussed of Mitochondrial-Related Alterations in Patients with BD and SCZ.

Markers		BD	SCZ	Sample Type	References
Mitochondrial complex I	NDUFV1	↓	—	Postmortem prefrontal cortex and hippocampus	Scola et al., <sup>4</sup> Andreazza et al. <sup>30</sup>
	NDUFS1	↓	—		
	NDUFS8	↓	—		
	NDUFS7	↓	—		
mtDNA polymorphisms	A10398G (ND3)	R	NA	Peripheral blood	Kato et al. <sup>54</sup>
	T12027C (ND4)	NA	R	Postmortem brain	Marchbanks et al. <sup>57</sup>
	T3644TC (ND1)	R	NA	Transmitochondrial cybrids	Munakata et al. <sup>58</sup>
nDNA polymorphisms	−796C>G (NDUFV2 at 18p11)	R	NA	Lymphoblastoid cells	Washizuka et al., <sup>60</sup> Washizuka et al. <sup>61</sup>
	−795T>G (NDUFV2 at 18p11)	R	NA		
	−602G>A (NDUFV2 at 18p11)	R	NA		
	−233T>C (NDUFV2 at 18p11)	R	NA		
nDNA-mtDNA crosstalk	DNA polymerase subunit $\gamma$	↓	—	Lymphoblastoid cells, peripheral blood mononuclear cells	Kato et al., <sup>66</sup> Munkholm et al. <sup>67</sup>
Lipid peroxidation	Malondialdehyde	↑	↑	Peripheral blood	Gonzalez-Liencrez et al., <sup>38</sup> Kunz et al., <sup>41</sup> Gubert et al. <sup>42</sup>
	4-Hydroxy-2-nonenal	↑	↑	Postmortem anterior cingulate and prefrontal cortex	Wang et al., <sup>34</sup> Andreazza et al. <sup>36</sup>
Antioxidant enzyme	8-Isoprostanes	↑	—	Postmortem prefrontal cortex	Andreazza et al. <sup>36</sup>
	Glutathione peroxidase	—	↑	Serum	Kuloglu et al. <sup>43</sup>
Protein alterations	Carbonyl content	↑	—	Postmortem prefrontal cortex	Andreazza et al., <sup>30</sup> Andreazza et al. <sup>36</sup>
	3-Nitrotyrosine content	↑	↑	Postmortem prefrontal cortex, peripheral blood	Andreazza et al., <sup>30</sup> Andreazza et al. <sup>35</sup>
RNA damage	8-Hydroxyguanosine	↑	↑	Postmortem hippocampus	Che et al. <sup>44</sup>

↑, increased; ↓, decreased; —, no specific or significant alteration; R, risk factor; NA, not applicable; BD, bipolar disorder; mtDNA, mitochondrial DNA; nDNA, nuclear DNA; SCZ, schizophrenia.

products such as 8-isoprostanes (8-ISO), malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), and acrolein.<sup>39,40</sup> MDA has been frequently found to be elevated in both BD and SCZ<sup>41–43</sup> and was negatively correlated with complex I activity.<sup>42</sup> Oxidative damage to fatty acids, which make up myelin, may cause degeneration of white matter tracts and produce abnormalities in neural circuits.<sup>40</sup> Indeed, elevated levels of 4-HNE have been found in myelin fractions from patients with BD and SCZ, with elevated levels of 8-ISO in BD.<sup>36</sup> It is also important to note that many other markers are specific to particular disease states. For example, increased GPx levels were found in SCZ but not BD,<sup>43</sup> while protein carbonylation was elevated in BD but not in SCZ.<sup>30</sup> Overall, these findings support the hypothesis that mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance contribute to the pathophysiology of BD and SCZ. Next, we explore upstream processes involved in controlling mitochondrial and ETC function in the context of BD and SCZ, including mitochondrial and nuclear genomics, mitochondrial dynamics and quality control, and Ca<sup>2+</sup> homeostasis.

### Mitochondrial and Nuclear Genomics

As BD and SCZ show a high degree of heritability,<sup>45,46</sup> studying where genetic mutations occur may provide

insight into possible pathways that are dysregulated in these diseases. While genetic alterations related to countless cellular processes have been reported in BD and SCZ,<sup>47,48</sup> we focus on those directly related to ETC function. While mitochondria contain their own DNA, this is not sufficient for function of the ETC.<sup>49</sup> Both mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA)-encoded proteins are essential for ETC assembly (Figure 1B). For example, complex I is composed of 37 nDNA-encoded and 7 mtDNA-encoded subunits. Importantly, a number of nDNA-encoded assembly factors or chaperones are required for the stability and proper assembly of ETC complexes.<sup>50</sup> nDNA-encoded proteins also regulate the replication, transcription, and repair of mtDNA.<sup>51,52</sup> Therefore, mutations in either nDNA or mtDNA have the potential to directly affect mitochondrial function.

mtDNA mutations likely contribute to BD and SCZ. mtDNA mutations (Table 1) are commonly associated with BD and SCZ. Furthermore, these disorders have higher rates of maternal inheritance than paternal inheritance, which aligns with the fact that mtDNA is inherited exclusively from the mother.<sup>45,53</sup> Dozens of mtDNA single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding ETC proteins have been associated with BD and SCZ.<sup>54–56</sup> These SNPs have the potential to affect ETC function. For example, the



mtDNA SNP 12027T>C, encoding the ND4 subunit of complex I, is associated with SCZ and with greater production of SOD, suggesting a compensatory response to increased ROS production.<sup>57</sup> mtDNA SNPs occurring in the ND1 and ND3 subunits of complex I are associated with BD and lead to impaired mitochondrial function in mtDNA cybrids.<sup>54,58</sup> Many other mtDNA SNPs have been associated with BD and SCZ, but the functional consequences of most of these have not been explored. Based on current evidence, it is likely that variants in genes encoding ETC proteins can directly affect mitochondrial function.

Mutations in nDNA are also involved in mitochondrial dysfunction. nDNA-encoded genes are important for the architecture, assembly, and catalytic functions of mitochondrial ETC.<sup>49</sup> Mutations in nDNA encoding complex I catalytic subunits have been shown to impair mitochondrial function.<sup>59</sup> Indeed, the complex I subunit NDUFV2 has been identified as a possible risk factor for BD; its gene is found at a well-replicated susceptibility locus for BD (18p11), and SNPs in this gene have been associated with BD.<sup>60</sup> One particular SNP (-602G>A) is associated with BD and results in decreased promoter activity.<sup>61</sup> Altered NDUFV2 expression levels have been reported in samples of both BD<sup>60,62</sup> and SCZ.<sup>63</sup> Downregulation of NDUFS7 has also been reported in BD,<sup>30,31</sup> which was correlated with reduced activity of complex I and increased protein oxidation.<sup>30</sup> nDNA-encoded proteins not only make up the majority of the ETC<sup>64,65</sup> but are also required for the stability of the ETC<sup>50</sup> and the replication, transcription, and repair of mtDNA.<sup>51,52</sup> For example, DNA polymerase subunit gamma (Pol $\gamma$ ), which is responsible for the replication of mtDNA, is downregulated in peripheral cells of patients with BD.<sup>66,67</sup> Interestingly, transgenic mice expressing neuron-specific mutant Pol $\gamma$  accumulate mtDNA mutations and demonstrate mood disorder-like behavior that is worsened by tricyclic antidepressants and improved by Li<sup>+</sup>.<sup>68</sup> The association between genes and symptoms in psychiatric disorders is often complex, but identifying risk genes may help shed light on potential mechanisms and therapeutic targets for these disorders.<sup>55,69,70</sup>

### Mitochondrial Dynamics and Trafficking

Mitochondria are dynamic organelles that undergo changes in morphology and localization; these changes affect cellular processes such as ATP production, mitosis, and mitophagy.<sup>71-73</sup> Mitophagy is a quality control process in which damaged mitochondria are degraded in lysosomes. Alterations in mitochondrial dynamics have been implicated in neurodegenerative diseases.<sup>74</sup> Initial investigations in psychiatric illnesses have suggested a role for altered mitochondrial dynamics in SCZ. However, these processes have not been thoroughly investigated in either SCZ or BD. Future research may help to answer these questions.

Mitochondrial dynamics involve changes in mitochondrial morphology through fusion and fission, as well as

movement through the cells via microtubule motor proteins (Figure 1A).<sup>71,75,76</sup> Fusion promotes diffusion of contents between mitochondria, spreading metabolites and enzymes,<sup>77</sup> diluting damaged proteins and DNA, and increasing communications with the endoplasmic reticulum.<sup>74,78</sup> On the other hand, fission is necessary for cell division and for maintaining mitochondrial quality control; damaged mitochondria are isolated by fission and subject to mitophagy.<sup>77</sup> Thus, both fission and fusion are necessary for optimal mitochondrial and cell function.

The fusion process is mediated by Mitofusin 1 (Mfn1), Mitofusin 2 (Mfn2),<sup>75,79</sup> and optic atrophy 1 (Opa1) protein.<sup>74</sup> Mfn2 is also crucial for mitochondrial tethering to ER membranes, forming mitochondria-associated ER membranes (MAMs).<sup>80</sup> MAMs allow for the transport of Ca<sup>2+</sup> and lipids from the ER to mitochondria and are important for mitophagy.<sup>80,81</sup> Knockout of Mfn2 in cells leads to fragmentation of mitochondria, disrupted MAMs,<sup>80</sup> and impaired mitophagy.<sup>82</sup> The role of fusion in psychiatric illnesses has not been established yet, but one analysis of postmortem prefrontal cortex samples revealed decreased levels of Opa1 in SCZ specimens.<sup>83</sup>

Mitochondrial fission is essential for cell proliferation and mitophagy.<sup>84,85</sup> The main mediators of fission are mitochondrial fission 1 protein (Fis1) and dynamin-related protein 1 (Drp1).<sup>74,86</sup> However, few studies to date have established the role for Fis1 and Drp1 in BD and SCZ; these represent potential targets for future investigation.<sup>83</sup> An interesting mechanism for altered mitochondrial dynamics in SCZ is through G72. G72 has previously been identified as a candidate gene for SCZ,<sup>87</sup> and levels of G72 protein appear to be substantially higher in the plasma of both medicated and unmedicated patients with SCZ.<sup>88</sup> While originally thought to modulate NMDA signaling, a recent investigation demonstrated that transfection of G72 into primary neurons induces mitochondrial fragmentation and increases dendritic branching.<sup>89</sup> Cells expressing a loss-of-function Drp1 mutant, which have impaired fission, exhibit drastically reduced fragmentation in response to G72.<sup>89</sup> Overexpression of G72 may promote mitochondrial fission and lead to altered neural connectivity. G72 is not only a promising peripheral biomarker but may also contribute to mitochondrial dysfunction in SCZ.

Mitochondrial dynamics involve not only the processes of fission and fusion but also movement of mitochondria through the cell.<sup>71</sup> The trafficking and localization of mitochondria in neurons are influenced by ATP and Ca<sup>2+</sup> concentration.<sup>90</sup> High levels of ATP increase mitochondrial motility in dendrites to areas of high energy demand<sup>91</sup>; in contrast, high levels of ADP and Ca<sup>2+</sup> inhibit movement.<sup>91-93</sup> Because localization of mitochondria is important for Ca<sup>2+</sup> homeostasis<sup>10</sup> and ATP provision,<sup>94</sup> impairment in mitochondrial trafficking can produce alterations in neurotransmitter release and synaptic function.<sup>90,95</sup> A key protein involved in mitochondrial trafficking is disrupted in schizophrenia (Disc1).<sup>71,96</sup> Disc1 associates with kinesin-1, which

is necessary for the anterograde movement of mitochondria.<sup>94</sup> In yeast, decreased Disc1 function results in decreased complex I activity and ATP production, as well as perturbed  $\text{Ca}^{2+}$  buffering.<sup>97</sup> The Disc1 SNP R37 W decreases Disc1 expression<sup>98</sup> and impairs anterograde movement of mitochondria.<sup>94</sup> Other Disc1 SNPs are associated with SCZ and BD, although the functional consequences are unknown.<sup>94,99,100</sup> Currently available research suggests that mitochondrial dynamics are impaired in SCZ, but it is unknown if mitochondrial dynamics are involved in other psychiatric illnesses.

### The Role of Calcium Homeostasis in Mitochondrial Dysfunction

Among other functions,  $\text{Ca}^{2+}$  influences cell metabolism, death/survival, and neurotransmission through regulation of the mitochondria. The primary uptake mechanism for  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria is through the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter (MCU).<sup>101,102</sup> While the affinity of the MCU for  $\text{Ca}^{2+}$  is low, localization of mitochondria to regions of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  influx, such as the ER and membrane channels, allows them to buffer the cell from large spikes in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.<sup>10,102</sup> Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  is extruded into the cytosol through exchangers that are coupled to the ETC (Figure 1 B).<sup>9,102</sup> Uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  into mitochondria enhances respiration by activating several dehydrogenases in the citric acid cycle.<sup>103</sup> The subsequent accumulation of NADH leads to an increased production of ATP, which is required to pump  $\text{Ca}^{2+}$  out of mitochondria.<sup>9,104</sup> While  $\text{Ca}^{2+}$  is a positive effector of mitochondrial function,  $\text{Ca}^{2+}$  overload causes uncoupling of the ETC and depolarization of the mitochondrial membrane.<sup>105,106</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  overload therefore decreases the mitochondrion's capacity to generate ATP and remove  $\text{Ca}^{2+}$ ,<sup>9</sup> inducing ROS production<sup>104</sup> and potentially leading to apoptosis. As mitochondrial ATP production and  $\text{Ca}^{2+}$  buffering are essential for neurotransmission and cell survival, dysfunction may alter neural plasticity.<sup>10,107</sup>

Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dyshomeostasis has long been implicated in BD and SCZ. For example, elevated  $\text{Ca}^{2+}$  are frequently observed in stimulated platelets from patients with untreated SCZ and BD.<sup>108-112</sup> Such findings are indicative of altered intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling but do not offer specific evidence of the processes involved. The ER is a likely source of  $\text{Ca}^{2+}$  dysfunction in BD and SCZ. Because the ER is a major source of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and closely associated with mitochondria through MAMs, dysfunctions in ER-mediated release of  $\text{Ca}^{2+}$  affect  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis within mitochondria.<sup>102,104</sup>

The ER releases  $\text{Ca}^{2+}$  largely through inositol triphosphate receptors (IP<sub>3</sub> R). IP<sub>3</sub> R is an ER membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channel that is activated by IP<sub>3</sub>. Dysregulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through IP<sub>3</sub>Rs disrupts mitochondrial function through  $\text{Ca}^{2+}$  overload.<sup>104</sup> In neurons, such events alter normal neurotransmitter release and synaptic plasticity.<sup>10</sup> Several lines of evidence suggest a role for IP<sub>3</sub>Rs in  $\text{Ca}^{2+}$

dyshomeostasis in BD and SCZ. Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  sensor-1 (NCS-1) protein levels are elevated in the dorsolateral PFC of patients with SCZ and BD but not depression.<sup>113,114</sup> NCS-1 increases cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels by enhancing IP<sub>3</sub> R activity; this process is blocked by therapeutic levels of  $\text{Li}^+$ .<sup>115,116</sup> Furthermore,  $\text{Li}^+$  and valproate inhibit enzymes in the IP cycle involved in the generation of IP<sub>3</sub>, decreasing IP<sub>3</sub> R activity.<sup>117,118</sup> As well, both typical and atypical antipsychotics inhibit IP<sub>3</sub>-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. Patients with untreated BD or SCZ may have altered sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing stimuli in part due to overexpression of NCS-1.<sup>119</sup>

The antiapoptotic protein Bcl-2 also inhibits IP<sub>3</sub>-mediated IP<sub>3</sub> R  $\text{Ca}^{2+}$  release,<sup>120</sup> thereby protecting mitochondria against  $\text{Ca}^{2+}$  overload.<sup>9</sup> Decreased levels of Bcl-2 protein have been reported in the frontal cortex of patients with BD<sup>121</sup> and the temporal cortex of patients with SCZ.<sup>122,123</sup> Bcl-2 SNPs in patients with BD are associated with lower levels of Bcl-2 messenger RNA and protein, elevated basal  $\text{Ca}^{2+}$ , and enhanced IP<sub>3</sub>R-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release.<sup>124,125</sup>  $\text{Li}^+$  has been shown to increase Bcl-2 expression in the central nervous system<sup>126</sup> and restores  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in Bcl-2 variants, further supporting a role for Bcl-2 in BD.<sup>124</sup> Bcl-2 not only reduces IP<sub>3</sub>R-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release<sup>120</sup> but also modulates membrane L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.<sup>127</sup> Cells with decreased levels of Bcl-2, such as in BD and SCZ, are therefore at greater risk of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload.  $\text{Ca}^{2+}$  dysregulation observed in BD and SCZ may be in part due to altered IP<sub>3</sub> R activity, leading to enhanced influx of  $\text{Ca}^{2+}$  from the ER to closely associated mitochondria.  $\text{Ca}^{2+}$  overload can depolarize the mitochondrial membrane and impair its other functions.<sup>105,106</sup>

It is important also to consider that mitochondrial function is crucial in the regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Impairments in mitochondrial function have the potential to dysregulate  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. For example, the mtDNA SNP 10398G>A, found in the region encoding the complex I subunit ND3, is associated with BD<sup>54</sup> and with higher mitochondrial pH and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations.<sup>128</sup> Moreover, SH-SY5Y cells chronically exposed to rotenone (>2 weeks), which induces 15% to 30% decreases in complex I function, demonstrate altered  $\text{Ca}^{2+}$  influx in response to stimulation, which is dependent in part on MCU.<sup>129</sup> This suggests that diminished ETC function, which is commonly observed in BD and SCZ, impairs the mitochondrion's ability to buffer intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Mitochondrial ROS can also alter  $\text{Ca}^{2+}$  flux by modulating redox-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels, such as TRPM2.<sup>130,131</sup> Disruptions in either mitochondrial function or intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis have the potential to exacerbate each other.

### Concluding Remarks

We have described a role for mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of major psychoses and discussed upstream pathways that may contribute to controlling mitochondrial function in BD and SCZ. Upstream pathways can be summarized as mutations in mtDNA and nDNA,

perturbed mitochondrial dynamics, and dysregulated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. BD and SCZ are complex and heterogeneous diseases; it is unlikely that all of these pathways are dysregulated in a given individual. Rather, different individuals may present with alterations in different processes that may converge upon mitochondrial dysfunction. The processes involved in energy production, mitochondrial dynamics, and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis are interdependent. Subtle alterations in one process may either be compensated or exacerbated by other processes, contributing to the complexity of these disorders. Despite this, the mitochondrial dysfunction present in BD appears to be distinct from that in SCZ. While both BD and SCZ are associated with mitochondrial dysfunction and redox modulations, BD is associated with decreased protein and gene expression of NDUFS7 and NDUFS8, 2 core subunits for electron transfer in complex I. As these subunits are mandatory for electron transfer to ubiquinone, patients with BD may be more susceptible to ROS generation by electron loss through complex I compared to those with SCZ. Altered expression of complex I subunits is reported in SCZ, but the direction of these findings is inconsistent, unlike the decreased levels observed in BD.<sup>4</sup>

BD features manic and depressive episodes. Studies to date have not been designed to address how mitochondrial function may change in each state of the illness within the same individual. Nevertheless, we might speculate that during manic episodes, patients experience a general increase in neurotransmission; this requires high levels of energy, suggesting an increase in mitochondria activity resulting in increased ATP and ROS production. Overproduction of mitochondrial ROS leads to changes in the redox state of certain proteins, altering their function. This may explain, in part, the cyclical nature of BD. Redox modulations to proteins may decrease mitochondrial activity, altering neurotransmission and producing symptoms of depression. Of course, it should be noted that the above mechanism is speculative, and longitudinal studies examining markers of mitochondrial function are crucial to determine how mitochondrial activity varies between mood states.

Understanding the upstream processes that affect mitochondrial function will help in identifying the different triggers of mitochondrial dysfunction in each of the 2 psychiatric illnesses. Ultimately, delineating the causes of mitochondrial dysfunction will guide rational development of novel therapeutics with better efficacy and fewer adverse effects.

#### Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: We thank the Brazilian government (CAPES) for supporting AM for his exchange doctorate and TMS in an exchange fellowship (CNPq-

SWB). ACA is funded by CHIR (MOP-143439), Ontario Mental Health Foundation, and Ontario Ministry of Research and Innovation (ERA-14-10-022).

#### References

1. Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, et al. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(1):19-28.
2. Judd LL, Schettler PJ, Akiskal HS, et al. Residual symptom recovery from major affective episodes in bipolar disorders and rapid episode relapse/recurrence. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(4):386-394.
3. Emsley R, Chiliza B, Asmal L, Harvey BH. The nature of relapse in schizophrenia. *BMC Psychiatry*. 2013;13(1):50.
4. Scola G, Kim HK, Young LT, Andreatza AC. A fresh look at complex I in microarray data: clues to understanding disease-specific mitochondrial alterations in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2013;73(2):e4-e5.
5. Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29(3):311-324.
6. Manji H, Kato T, Di Prospero N, et al. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:293-307.
7. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*. 2006;16(14):R551-R560.
8. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990;348(6299):334-336.
9. Gleichmann M, Mattson MP. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(7):1261-1273.
10. Jonas E. BCL-xL regulates synaptic plasticity. *Mol Interv*. 2006;6(4):208-222.
11. Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(1):65-74.
12. Akarsu S, Torun D, Bolu A, et al. Mitochondrial complex I and III gene mRNA levels in schizophrenia, and their relationship with clinical features. *J Mol Psychiatry*. 2014;2(1):6.
13. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):797-803.
14. Streck EL, Czapski GA, Gonçalves Da Silva C. Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:826046.
15. Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol Neurodegener*. 2009;4:24.
16. Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2001;12(6):449-457.
17. Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med*. 1993;15(4):435-445.

18. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
19. Rhee SG. Cell signaling: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 2006;312(5782):1882-1883.
20. Liemburg-Apers DC, Willems PHGM, Koopman WJH, Grefte S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch Toxicol.* 2015; 89(8):1209-1226.
21. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12): 931-947.
22. Li N, Ragheb K, Lawler G, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8516-8525.
23. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11(6):851-876.
24. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-1658.
25. LeBel CP, Bondy SC. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol.* 1991;13(3):341-346.
26. Zickermann V, Kerscher S, Zwicker K, Tocilescu MA, Radermacher M, Brandt U. Architecture of complex I and its implications for electron transfer and proton pumping. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2009;1787(6):574-583.
27. Kudin AP, Bimpong-Buta NYB, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4127-4135.
28. Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.* 2004;279(38):39414-39420.
29. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2012;1817(6): 851-862.
30. Andreatza AC, Shao L, Wang J-F, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2010;67(4):360-368.
31. Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2006;31(3):189-196.
32. De Sousa RT, Streck EL, Zanetti M V, et al. Lithium increases leukocyte mitochondrial complex I activity in bipolar disorder during depressive episodes. *Psychopharmacology (Berl).* 2015;232(1):245-250.
33. Brown NC, Andreatza AC, Young LT. An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2014;218:61-68.
34. Wang J-F, Shao L, Sun X, Young LT. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord.* 2009;11(5): 523-529.
35. Andreatza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, et al. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2009;34(4):263-271.
36. Andreatza AC, Wang J-F, Salmasi F, Shao L, Young LT. Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder. *J Neurochem.* 2013;127(4):552-561.
37. Ciobica A, Padurariu M, Dobrin I, Stefanescu C, Dobrin R. Oxidative stress in schizophrenia—focusing on the main markers. *Psychiatr Danub.* 2011;23(3):237-245.
38. Gonzalez-Liencreas C, Tas C, Brown EC, et al. Oxidative stress in schizophrenia: a case-control study on the effects on social cognition and neurocognition. *BMC Psychiatry.* 2014;14(1):268.
39. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins: potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2008;153(1): 6-20.
40. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet.* 1984;2(8411):1095.
41. Kunz M, Gama CS, Andreatza AC, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2008;32(7):1677-1681.
42. Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, et al. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res.* 2013;47(10): 1396-1402.
43. Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct.* 2002;20(2): 171-175.
44. Che Y, Wang JF, Shao L, Young LT. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. *J Psychiatry Neurosci.* 2010;35(5): 296-302.
45. Lichtenstein P, Yip BH, Björk C, et al. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet.* 2009; 373(9659):234-239.
46. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature.* 2009;460(7256):748-752.
47. Ferreira MAR, O'Donovan MC, Meng YA, et al. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet.* 2008;40(9):1056-1058.
48. Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet.* 2013;45(10):1150-1159.

49. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008;88(2): 611-638.
50. Diaz F, Kotarsky H, Fellman V, Moraes CT. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011;16(4):197-204.
51. Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum Reprod.* 2000;15(Suppl 2):11-17.
52. Kazak L, Reyes A, Holt IJ. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(11):726-726.
53. McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, DePaulo JR. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet.* 1995;56(6):1277-1286.
54. Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N. Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2001; 62(3):151-164.
55. Sequeira A, Rollins B, Magnan C, et al. Mitochondrial mutations in subjects with psychiatric disorders. *PLoS One.* 2015; 10(5):e0127280.
56. Martorell L, Segués T, Folch G, et al. New variants in the mitochondrial genomes of schizophrenic patients. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(5):520-528.
57. Marchbanks RM, Ryan M, Day INM, Owen M, McGuffin P, Whatley SA. A mitochondrial DNA sequence variant associated with schizophrenia and oxidative stress. *Schizophr Res.* 2003;65(1):33-38.
58. Munakata K, Tanaka M, Mori K, et al. Mitochondrial DNA 3644T→C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics.* 2004;84(6):1041-1050.
59. Pagniez-Mammeri H, Lombes A, Brivet M, et al. Rapid screening for nuclear genes mutations in isolated respiratory chain complex I defects. *Mol Genet Metab.* 2009;96(4):196-200.
60. Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, et al. Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFB2 at 18p11 with bipolar disorder. *Am J Med Genet.* 2003;120B(1):72-78.
61. Washizuka S, Iwamoto K, Kazuno AA, et al. Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFB2 at 18p11 with bipolar disorder in Japanese and the National Institute of Mental Health pedigrees. *Biol Psychiatry.* 2004;56(7):483-489.
62. Nakatani N, Hattori E, Ohnishi T, et al. Genome-wide expression analysis detects eight genes with robust alterations specific to bipolar I disorder: relevance to neuronal network perturbation. *Hum Mol Genet.* 2006;15(12):1949-1962.
63. Dror N, Klein E, Karry R, et al. State-dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002;7(9): 995-1001.
64. Andreu AL, DiMauro S. Current classification of mitochondrial disorders. *J Neurol.* 2003;250(12):1403-1406.
65. Pecina P, Houstková H, Hansíková H, Zeman J, Houstek J. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res.* 2004;53(Suppl 1):S213-S223.
66. Kato T, Hayashi-Takagi A, Toyota T, Yoshikawa T, Iwamoto K. Gene expression analysis in lymphoblastoid cells as a potential biomarker of bipolar disorder. *J Hum Genet.* 2011; 56(11):779-783.
67. Munkholm K, Pejts L, Vinberg M, Kessing LV. A composite peripheral blood gene expression measure as a potential diagnostic biomarker in bipolar disorder. *Transl Psychiatry.* 2015; 5(8):e614.
68. Kasahara T, Kubota M, Miyauchi T, et al. Mice with neuron-specific accumulation of mitochondrial DNA mutations show mood disorder-like phenotypes. *Mol Psychiatry.* 2006;11(6): 577-593.
69. Giusti L, Mantua V, Da Valle Y, et al. Search for peripheral biomarkers in patients affected by acutely psychotic bipolar disorder: a proteomic approach. *Mol Biosyst.* 2014;10(6): 1246-1254.
70. Yamamoto BK, Raudensky J. The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(4):203-217.
71. Atkin T, MacAskill F, Brandon NJ, Kittler JT. Disrupted in Schizophrenia-1 regulates intracellular trafficking of mitochondria in neurons. *Mol Psychiatry.* 2011;16(2):122-124.
72. Twig G, Elorza A, Molina AJ, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 2008;27(2):433-446.
73. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013;17(4):491-506.
74. Archer SL. Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med.* 2013;369: 2236-2251.
75. Wang C, Du W, Su QP, et al. Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation. *Cell Res.* 2015;25(10):1108-1120.
76. Stephen T, Gupta Agarwal S, Kittler JT. Mitochondrial dynamics in astrocytes. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(5): 1302-1310.
77. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2012;1817(10): 1833-1838.
78. Chen H, Vermulst M, Wang YE, et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell.* 2010;141(2):280-289.
79. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 5):867-874.
80. De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 2008;456(7222):605-610.
81. Vance JE. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2014;1841(4):595-609.
82. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell.* 2010;141(4):656-667.
83. Rosenfeld M, Brenner-Lavie H, Ari SGB, Kavushansky A, Ben-Shachar D. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011;69(10):980-988.

84. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, et al. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol.* 2009;187(7):1023-1036.
85. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014;505(7483):335-343.
86. Chan DC. Mitochondrial dynamics in disease. *N Engl J Med.* 2007;356(17):1707-1709.
87. Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, et al. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(21):13675-13680.
88. Lin C-H, Chang H-T, Chen Y-J, et al. Distinctly higher plasma G72 protein levels in patients with schizophrenia than in healthy individuals. *Mol Psychiatry.* 2014;19(6):636-637.
89. Kvaajo M, Dhillia A, Swor DE, Karayiorgou M, Gogos JA. Evidence implicating the candidate schizophrenia/bipolar disorder susceptibility gene G72 in mitochondrial function. *Mol Psychiatry.* 2008;13(7):685-696.
90. MacAskill AF, Atkin T, Kittler JT. Mitochondrial tracking and the provision of energy and calcium buffering at excitatory synapses. *Eur J Neurosci.* 2010;32(2):231-240.
91. MacAskill AF, Kittler JT. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol.* 2010;20(2):102-112.
92. Mironov SL. ADP regulates movements of mitochondria in neurons. *Biophys J.* 2007;92(8):2944-2952.
93. Wang X, Schwarz TL. The Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell.* 2009;136(1):163-174.
94. Ogawa F, Malavasi EL V, Crummie DK, et al. DISC1 complexes with TRAK1 and Miro1 to modulate anterograde axonal mitochondrial trafficking. *Hum Mol Genet.* 2014;23(4):906-919.
95. Kang JS, Tian JH, Pan PY, et al. Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell.* 2008;132(1):137-148.
96. Taya S, Shinoda T, Tsuboi D, et al. DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci.* 2007;27(1):15-26.
97. Park Y-U, Jeong J, Lee H, et al. Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with Mitofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(41):17785-17790.
98. Thomson P, Parla JS, McRae F, et al. 708 Common and 2010 rare DISC1 locus variants identified in 1542 subjects: analysis for association with psychiatric disorder and cognitive traits. *Mol Psychiatry.* 2014;19(6):668-675.
99. Mackie S, Millar JK, Porteous DJ. Role of DISC1 in neural development and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(1):95-102.
100. Sætre P, Agartz I, De Francis A, et al. Association between a disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) single nucleotide polymorphism and schizophrenia in a combined Scandinavian case-control sample. *Schizophr Res.* 2008;106(2-3):237-241.
101. Santo-Domingo J, Demareux N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2010;1797(6-7):907-912.
102. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):566-578.
103. Nichols BJ, Denton RM. Towards the molecular basis for the regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Mol Cell Biochem.* 1995;149-150:203-212.
104. Brookes PS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *AJP Cell Physiol.* 2004;287(4):C817-C833.
105. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 1996;16(19):6125-6133.
106. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol.* 2000;529(1):57-68.
107. Nguyen PV, Marin L, Atwood HL. Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *J Neurophysiol.* 1997;78(1):281-294.
108. Dubovsky SL, Christiano J, Daniell LC, et al. Increased platelet intracellular calcium concentration in patients with bipolar affective disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 1989;46(7):632-638.
109. Das I, Khan NS, Puri BK, Sooranna SR, de Belleruche J, Hirsch SR. Elevated platelet calcium mobilization and nitric oxide synthase activity may reflect abnormalities in schizophrenic brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212(2):375-380.
110. Kusumi I, Koyama T, Yamashita I. Thrombin-induced platelet calcium mobilization is enhanced in bipolar disorders. *Biol Psychiatry.* 1992;32(8):731-734.
111. Yamawaki S. Enhanced calcium response to serotonin in platelets from patients with affective disorders. *J Psychiatry Neurosci.* 1996;21(5):321-324.
112. Suzuki K, Kusumi I, Sasaki Y, Koyama T. Serotonin-induced platelet intracellular calcium mobilization in various psychiatric disorders: is it specific to bipolar disorder? *J Affect Disord.* 2001;64(2-3):291-296.
113. Koh PO, Undie AS, Kabbani N, Levenson R, Goldman-Rakic PS, Lidow MS. Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):313-317.
114. Bai J, He F, Novikova SI, et al. Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biol Psychiatry.* 2004;56(6):427-440.
115. Koizumi S, Rosa P, Willars GB, et al. Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem.* 2002;277(33):30315-30324.
116. Schlecker C, Boehmerle W, Jeromin A, et al. Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1668-1674.
117. Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell.* 1989;59(3):411-419.

118. Eickholt BJ, Towers GJ, Ryves WJ, et al. Effects of valproic acid derivatives on inositol trisphosphate depletion, teratogenicity, glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition, and viral replication: a screening approach for new bipolar disorder drugs derived from the valproic acid core structure. *Mol Pharmacol*. 2005;67(5):1426-1433.
119. Sczekan SR, Strumwasser F. Antipsychotic drugs block IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup>-release from rat brain microsomes. *Biol Psychiatry*. 1996;40(6):497-502.
120. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:73-91.
121. Kim H-W, Rapoport SI, Rao JS. Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Neurobiol Dis*. 2010;37(3):596-603.
122. Jarskog LF, Gilmore JH, Selinger ES, Lieberman JA. Cortical Bcl-2 protein expression and apoptotic regulation in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000;48(7):641-650.
123. Jarskog LF, Selinger ES, Lieberman JA, Gilmore JH. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *Am J Psychiatry*. 2004;161(1):109-115.
124. MacHado-Vieira R, Pivovarova NB, Stanika RI, et al. The Bcl-2 gene polymorphism rs956572AA increases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated endoplasmic reticulum calcium release in subjects with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2011;69(4):344-352.
125. Uemura T, Green M, Corson TW, Perova T, Li PP, Warsh JJ. Bcl-2 SNP rs956572 associates with disrupted intracellular calcium homeostasis in bipolar I disorder. *Bipolar Disord*. 2011;13(1):41-51.
126. Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, et al. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem*. 1999;72(2):879-882.
127. Díaz-Prieto N, Herrera-Peco I, de Diego AMG, et al. Bcl2 mitigates Ca<sup>2+</sup> entry and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload through downregulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in PC12 cells. *Cell Calcium*. 2008;44(4):339-352.
128. Kazuno A, Munakata K, Nagai T, et al. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet*. 2006;2(8):e128.
129. Sherer TB, Trimmer PA, Borland K, Parks JK, Bennett JP, Tuttle JB. Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res*. 2001;891(1-2):94-105.
130. Yan Y, Wei C, Zhang W, Cheng H, Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(7):821-826.
131. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun*. 2013;4:1611.





## Manuscrito 2

Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In Vitro* Exposure





## Research Article

# Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In Vitro* Exposure

Alencar Kolinski Machado,<sup>1,2</sup> Ana Cristina Andreazza,<sup>3,4</sup> Tatiane Morgana da Silva,<sup>5</sup>  
 Aline Augusti Boligon,<sup>6</sup> Vanusa do Nascimento,<sup>2,7</sup> Gustavo Scola,<sup>3,4</sup> Angela Duong,<sup>3</sup>  
 Francine Carla Cadoná,<sup>2,8</sup> Euler Esteves Ribeiro,<sup>2,7</sup> and Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,2,8</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>Biogenomics Laboratory, Department of Morphology, Health Science Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup>Department of Psychiatry, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

<sup>4</sup>Centre for Addiction and Mental Health, Toronto, ON, Canada

<sup>5</sup>Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

<sup>6</sup>Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>7</sup>Third Age Open University, University of Amazonas State, Manaus, AM, Brazil

<sup>8</sup>Postgraduate Program of Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Ivana Beatrice Mânica da Cruz; [ivana.biogenomica@gmail.com](mailto:ivana.biogenomica@gmail.com)

Received 6 July 2016; Revised 15 August 2016; Accepted 22 August 2016

Academic Editor: Janusz Gebicki

Copyright © 2016 Alencar Kolinski Machado et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Neuropsychiatric diseases, such as bipolar disorder (BD) and schizophrenia (SCZ), have a very complex pathophysiology. Several current studies describe an association between psychiatric illness and mitochondrial dysfunction and consequent cellular modifications, including lipid, protein, and DNA damage, caused by cellular oxidative stress. *Euterpe oleracea* (açai) is a powerful antioxidant fruit. Açai is an Amazonian palm fruit primarily found in the lowlands of the Amazonian rainforest, particularly in the floodplains of the Amazon River. Given this proposed association, this study analyzed the potential *in vitro* neuropharmacological effect of *Euterpe oleracea* (açai) extract in the modulation of mitochondrial function and oxidative metabolism. SH-SY5Y cells were treated with rotenone to induce mitochondrial complex I dysfunction and before and after we exposed the cells to açai extract at 5 µg/mL. Treated and untreated cells were then analyzed by spectrophotometric, fluorescent, immunological, and molecular assays. The results showed that açai extract can potentially increase protein amount and enzyme activity of mitochondrial complex I, mainly through NDUFS7 and NDUFS8 overexpression. Açai extract was also able to decrease cell reactive oxygen species levels and lipid peroxidation. We thus suggest açai as a potential candidate for drug development and a possible alternative BD therapy.

## 1. Introduction

Neuropsychiatric diseases are an important problem in public health around the world [1, 2]. Bipolar disorder (BD) is a chronic mental illness that causes significant impairment in life quality and is an important cause of disability in young people [3, 4]. The prevalence of BD in the world is around 3%, and it can affect populations independently

of socioeconomic status or nationality [3]. Patients with BD present recurrent episodes of mania and depression, but the etiology of the disease is still not completely clear. Usually subjects with BD have a genetic component that interacts with the environment to develop the disease [5]. Some evidence suggests the significant role of mitochondria in BD [6–8]. Current research has demonstrated that BD is associated with mitochondrial complex I deficiency and it

can decrease ATP production and increase reactive oxygen species (ROS) levels. Consequently, the cells present oxidative stress followed by different cell damage, including lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage [9, 10]. The brain is one of the tissues most affected by mitochondrial dysfunction due to its high sensitivity to oxidative stress and energy demands for normal neurotransmission [11, 12].

Currently, the pharmacotherapy for BD involves mood stabilizers and second-generation antipsychotics [13–15] whose side effects are proportional to the duration of treatment and dose of medication [4], and these side effects are the main cause of treatment interruption. The prolonged use of different antipsychotic medications has been related to the incidence of metabolic dysfunctions, such as obesity, dyslipidemia, high blood pressure, and increased glycaemia levels [1, 4]. Lithium, the main mood stabilizer used in BD therapy [2], acts directly on cell mitochondria. Hou et al. [16] showed that lithium is able to protect dopaminergic cells against mitochondrial complex I deficiency induced by rotenone exposition; however, lithium can also cause side effects, including memory disorders, renal dysfunction [17–19], and metabolic diseases such as diabetes and hypothyroidism [4]. Therapy for BD is also still limited, because the results obtained from drug development studies are usually unsatisfactory or unsafe, and the action mechanism of some medications is still unclear [2]. Functional foods and natural product studies that could possibly improve mitochondrial function might thus help subjects with BD to recover their quality of life and decrease the extensive burden of this disease.

This is the case of *Euterpe oleracea*, an Amazonian Brazilian fruit popularly known as açai [20]. Açai presents several bioactive molecules with different bioactive properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activities, and it is also able to modulate calcium homeostasis and autophagy on brain cells [21–26]. Açai's biological effects are related to its chemical matrix, which includes numerous phytochemicals components such as flavonoids [27]. These molecules can neutralize ROS by itself and/or inactivate molecules with prooxidant capacity [28–30]. It is also known that flavonoids have potent anti-inflammatory effects [31, 32]. In an *in vitro* study, Xie et al. [33] demonstrated that velutin, found in açai fruit, is able to decrease proinflammatory cytokines as tumor necrosis factor- (TNF-) alpha and interleukin- (IL-) 6 in macrophage cells. Another flavonoid found in açai fruit is apigenin [34]. Apigenin has been identified as a neuroprotective biomolecule against Alzheimer's disease [35], Parkinson disease [36], and ischemic injury [37, 38]. Since açai is a rich source of flavonoids and other compounds with bioactive power we hypothesize that freeze-dried hydroalcoholic açai extract might have positive effects against neuropsychiatric diseases as BD.

On this basis, we developed a study of açai freeze-dried hydroalcoholic extract effects on neuronal-like cells (SH-SY5Y) with mitochondrial complex I deficiency. The main objective of this research was to analyze whether *Euterpe oleracea* extract is able to prevent and/or reverse mitochondrial dysfunction induced by rotenone exposure and also protect against cell imbalance consequences. This study could open

new exploratory means of drug development and targets of therapy for BD.

## 2. Materials and Methods

**2.1. *Euterpe oleracea* Extract and Quantification of Compounds.** Fresh açai fruits were obtained from a harvesting area in Manaus city, Amazonas state. To prevent any change in the fruit quality and properties of the components, they were frozen immediately after the fruit harvest and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The frozen fruits were transported to the Biogenomics Laboratory at the Federal University of Santa Maria. The fruits were confirmed to be *Euterpe oleracea* by a specialist in plant ecology and botany. A freeze-dried hydroalcoholic extract of açai was obtained. First of all the açai fruits were manually macerated to remove the seeds. Then the skin and pulp were placed in ethanol (Neon® commercial-03467; Sao Paulo, SP, Brazil) 70% (70% absolute ethanol:30% distilled water; v:v) for 21 days at a concentration of 300 mg/mL. After the period of extraction, the material was filtered and the liquid part was lyophilized after ethanol removal. Freeze-dried hydroalcoholic extract powder was then conducted to compounds quantification and characterization.

To determine the main molecules present in açai hydroalcoholic extract as a chemical matrix we performed the analysis through high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) using the Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) system (Shimadzu, Kyoto, Japan). The freeze-dried hydroalcoholic extract was analyzed following the protocol reported by Klimaczewski et al. [39] at 15 mg/mL. The standards used in this analysis included formic acid, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, catechin, and epicatechin purchased from Merck (Darmstadt, Germany), chrysin, luteolin, apigenin, orientin, and vitexin, acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and cyanidin 3-*O*-glucoside acquired from ChromaDex (Irvine, CA, USA). We calculated the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) based on the standard deviation of response and the slope using three independent curves of analysis, as described by Abbas et al. [40].

**2.2. Cell Culture and Treatments.** Neuronal-like cells SH-SY5Y were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® CRL-2266™; Manassas, VA, USA) and cultured in DMEM/F12 medium (Gibco® Thermo Fisher-11320033; Mississauga, ON, Canada) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco® Thermo Fisher-12484028; Mississauga, ON, Canada) and 1% penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL) (Gibco® Thermo Fisher-15140122; Mississauga, ON, Canada). Cells were cultured until there was an ideal confluence and number of cells to perform all the treatments and experiments at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  and 95%  $\text{O}_2$  in a humidified environment.

The treatments were performed to measure the capacity of açai freeze-dried hydroalcoholic extract to prevent and/or reverse mitochondrial complex I deficiency and the possible damage caused by this cellular imbalance. To induce mitochondrial complex I deficiency we exposed the cells

to rotenone in different concentrations (5, 15, and 30 nM) during 24 h incubation as described by Kim et al. [41]. Before and after rotenone exposure treatment was performed with hydroalcoholic lyophilized açai extract at optimal cells culture conditions.

**2.3. Cell Viability Assay.** To select the most effective concentration of açai freeze-dried hydroalcoholic extract in SH-SY5Y cells we measured cell viability response by XTT (tetrazolium salt; Sigma-Aldrich-x4251; St. Louis, MO, USA) assay, following the manufacturer's instructions. The cells were exposed to different concentrations of açai freeze-dried hydroalcoholic extract (0.001 µg/mL–1000 µg/mL) under different periods of incubation (24, 48, and 72 hours). The most effective freeze-dried extract concentration and time of incubation treatment were selected calculating the EC50 to perform all the other assays of this research, adding açai freeze-dried hydroalcoholic extract before or after rotenone exposure.

**2.4. Scanning Confocal Microscopy Analysis of Cell Morphology.** SH-SY5Y cells treated with rotenone and/or açai freeze-dried hydroalcoholic extract were placed under sterile glass cover lids (VWR Collection-2441; Radnor, PA, USA) in 6-well cell culture plates with  $7.5 \times 10^4$  cells/well overnight to evaluate cell morphology. Cells were treated with rotenone and/or açai freeze-dried hydroalcoholic extract according to the experimental designs performed for cell viability analysis. After all treatments the cells were fixed with ethanol:acetic acid (3:1, v:v). Images were acquired using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti-U; Mississauga, ON, Canada) and a high sensitivity QImaging camera, model Retiga™ 1300 (QImaging Scientific cameras; Surrey, BC, Canada) at 20x magnification.

**2.5. Analysis of Human Mitochondrial Oxidative Phosphorylation (OXPHOS).** The oxidative phosphorylation of neuronal-like cells previously treated with rotenone and/or açai freeze-dried hydroalcoholic extract for both research elements (prevent and reverse) was measured through a human oxidative phosphorylation magnetic bead panel (Millipore, H0XPSMAG-16K; Toronto, ON, Canada) following the manufacturer's instructions. In this assay we analyzed all the mitochondrial complexes (I, II, III, IV, and V) simultaneously in an individual well reaction per treatment in triplicate. Results were obtained using the high precision machine Megapix® (Luminex Corporation xMAP Technology; Toronto, ON, Canada).

**2.6. Mitochondrial Complex I Enzyme Activity.** We measured mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase complex (mitochondrial complex I) activity using a mitochondrial complex I enzyme activity kit (Abcam-ab-109721; Cambridge, UK) following the manufacturer's instructions. This is a colorimetric assay based on enzyme immunocapture through the oxidation of NADH to NAD<sup>+</sup>.

**2.7. Protein Expression of Mitochondrial Complex I Subunits.** To analyze the effect of açai on the amount of protein in the mitochondrial complex I Q module subunits NDUFS7 and NDUFS8 and also in N module subunits NDUFV1 and NDUFV2, four very important subunits associated with complex I activity, we performed western blot analysis according to a protocol reported by Andrezza et al. [42]. The cell lysate of each treatment was loaded on to 12% polyacrylamide (Sigma-Aldrich-M7279; St. Louis, MO, USA) gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare-10600023; Little Chalfont, UK). The membranes were stained with Memcode reversible stain (Thermo Fisher-23227; Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. After a blocking process (1 h, 5% BSA) the membranes were incubated with primary anti-NDUFS7, anti-NDUFS8, anti-NDUFV1, or anti-NDUFV2 (Santa Cruz Biotechnology-98644; Dallas, USA) (Abcam-ab96123; Cambridge, UK) rabbit polyclonal antibodies (1:1000). After 90 minutes of incubation we added the secondary anti-rabbit (1:1000). Membranes were incubated with ECL western blotting substrate (Thermo Fisher-32106; Mississauga, ON, Canada) and analyzed by acquiring images using Versa Doc equipment 5000 MP (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada) and Quantity One Analysis software version 4.6.9 (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). Sample intensity was normalized by beta-actin protein levels.

**2.8. Gene Expression of Mitochondrial Complex I Subunits Genes.** To complement mitochondrial complex I analysis, we measured NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, and NDUFV2 gene expression using qRT-PCR. Initially the RNA was extracted from treated cells using Trizol® reagent (Thermo Fischer-15586026; Mississauga, ON, Canada). After RNA quantification through a NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer System® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), RNA was converted to complementary DNA (cDNA) using a QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen-205311; Toronto, ON, Canada). Real-time PCR was performed using NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, or NDUFV2 QuantiTect® Primers (Qiagen-cat. QT0045850; Toronto, ON, Canada) and QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen-cat. 204054; Toronto, ON, Canada) on CFX 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Beta-actin was used as the housekeeping gene to normalize the gene expression of all samples.

**2.9. Total Levels of ROS Measurement.** Total levels of ROS were determined in treated SH-SY5Y cells using 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay, as described by Costa et al. [43]. DCFH-DA (Sigma-Aldrich-D6883; St. Louis, MO, USA) is a nonfluorescent compound that is deacetylated by mitochondrial esterase enzymes to DCFH which reacts with ROS molecules and becomes DCF, a fluorescent compound. Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm.

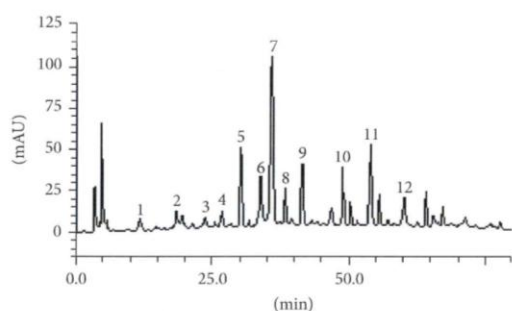


FIGURE 1: Representative high performance liquid chromatography profile of *Euterpe oleracea* freeze-dried hydroalcoholic extract. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), *p*-coumaric acid (peak 5), epicatechin (peak 6), orientin (peak 7), vitexin (peak 8), cyanidin-3-*O*-glucoside (peak 9), luteolin (peak 10), apigenin (peak 11), and chrysin (peak 12).

**2.10. Lipid Peroxidation Analysis.** Lipid peroxidation was analyzed using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) kit assay (Cayman Chemical-700870; Ann Arbor, MI, USA), following the instructions described by the manufacturer. The malondialdehyde (MDA)/thiobarbituric acid reaction was determined measuring the absorbance at 535 nm.

**2.11. Statistical Analysis.** The data was first transformed to percentages against a negative control group. Results from dose-response curves were statistically analyzed using one-way ANOVA, and other results were analyzed using two-way ANOVA analysis of variance. Both were followed by a Tukey *post hoc* test, using Graphpad prism software, version 5.0 (Graphpad Prism software, 2015; San Diego, CA, USA). Results of  $p < 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

Twelve molecules were quantified in the açai freeze-dried hydroalcoholic extract: gallic acid (retention time,  $R_t = 10.27$  min; peak 1), catechin ( $R_t = 17.83$  min; peak 2), chlorogenic acid ( $R_t = 23.91$  min; peak 3), caffeic acid ( $R_t = 26.11$  min; peak 4), *p*-coumaric acid ( $R_t = 29.97$  min; peak 5), epicatechin ( $R_t = 34.08$  min; peak 6), orientin ( $R_t = 35.14$  min; peak 7), vitexin ( $R_t = 37.41$  min; peak 8), cyanidin-3-*O*-glucoside ( $R_t = 41.65$  min; peak 9), luteolin ( $R_t = 48.25$  min; peak 10), apigenin ( $R_t = 54.13$  min; peak 11), and chrysin ( $R_t = 60.27$  min; peak 12) (Figure 1 and Table 1). The three most concentrated molecules found in the extract were orientin ( $8.05 \pm 0.03$ ), *p*-coumaric acid ( $3.52 \pm 0.01$ ), and apigenin ( $3.49 \pm 0.01$ ).

The cell viability response of neuronal-like SH-SY5Y cells to different concentrations of açai freeze-dried hydroalcoholic extract was analyzed (Figure 2). Initially, the cell response to rotenone treatments at 5, 15, and 30 nM was also measured to confirm the toxicity of these concentrations. Cell morphology and rate of proliferation were also

TABLE 1: Components of hydroalcoholic *Euterpe oleracea* freeze-dried hydroalcoholic extract.

Compounds	<i>Euterpe oleracea</i>		LOD	LOQ
	Fruits (mg/g)	%	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Gallic acid	$0.73 \pm 0.01^a$	0.07	0.011	0.036
Catechin	$0.75 \pm 0.03^a$	0.07	0.028	0.093
Chlorogenic acid	$0.41 \pm 0.01^b$	0.04	0.023	0.075
Caffeic acid	$0.76 \pm 0.01^a$	0.07	0.008	0.026
<i>p</i> -Coumaric acid	$3.52 \pm 0.01^c$	0.35	0.031	0.102
Epicatechin	$2.37 \pm 0.02^d$	0.23	0.024	0.079
Orientin	$8.05 \pm 0.03^e$	0.80	0.016	0.053
Vitexin	$2.19 \pm 0.01^f$	0.21	0.015	0.048
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	$2.62 \pm 0.01^g$	0.26	0.009	0.029
Luteolin	$2.57 \pm 0.02^g$	0.25	0.021	0.070
Apigenin	$3.49 \pm 0.01^c$	0.34	0.027	0.089
Chrysin	$1.83 \pm 0.01^h$	0.18	0.013	0.043

Açai freeze-dried hydroalcoholic extract compound determination. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at  $p < 0.05$ .

analyzed under rotenone and/or açai freeze-dried hydroalcoholic extract treatments. As expected, rotenone treatments decreased cell viability in a dose-dependent way with a rate of mortality about 24% at 5 nM, 26% at 15 nM, and 43% at 30 nM of rotenone (Figure 2(a)). On the other hand, there was a hormetic response of neuronal-like cells under açai extract concentrations mainly after 48 and 72 h of treatment (Figures 2(c) and 2(d)) increasing the cell viability rate from  $0.005 \mu\text{g/mL}$  until  $100 \mu\text{g/mL}$  of açai freeze-dried extract. The açai extract significantly increased cell viability, mainly after 48 h of incubation, compared to the negative control. We determined the  $EC_{50}$  of açai freeze-dried hydroalcoholic extract for this dose-response curve, and the value obtained was  $5 \mu\text{g/mL}$ . All other experiments were performed using this specific concentration and period of incubation for the açai freeze-dried extract.

Scanning confocal microscopy analysis showed that cell morphology was preserved even at rotenone treatments; however cell proliferation decreased considerably at these conditions of exposition (Figures 2(g), 2(h), and 2(i)). The concomitant açai freeze-dried hydroalcoholic extract exposition at  $5 \mu\text{g/mL}$  (Figure 2(f)) retained cell morphology and recovered the proliferation of cells exposed to different concentrations of rotenone (Figures 2(j)–2(o)) similarly to the final negative control (Figure 2(p)). In both experimental designs (prevent and reverse) açai extract was able to stimulate cell proliferation compared to the negative control, neutralizing the rotenone effect.

The capacity of açai to prevent and/or reverse mitochondrial function was evaluated from these results. The OXPHOS analysis showed a decreased protein expression for mitochondrial complex I and açai freeze-dried hydroalcoholic extract presented an increased potential. Açai supplementation at  $5 \mu\text{g/mL}$  also improved the mitochondrial complex I proteins of neuronal-like cells in both experimental designs, mainly preventing the rotenone effects of

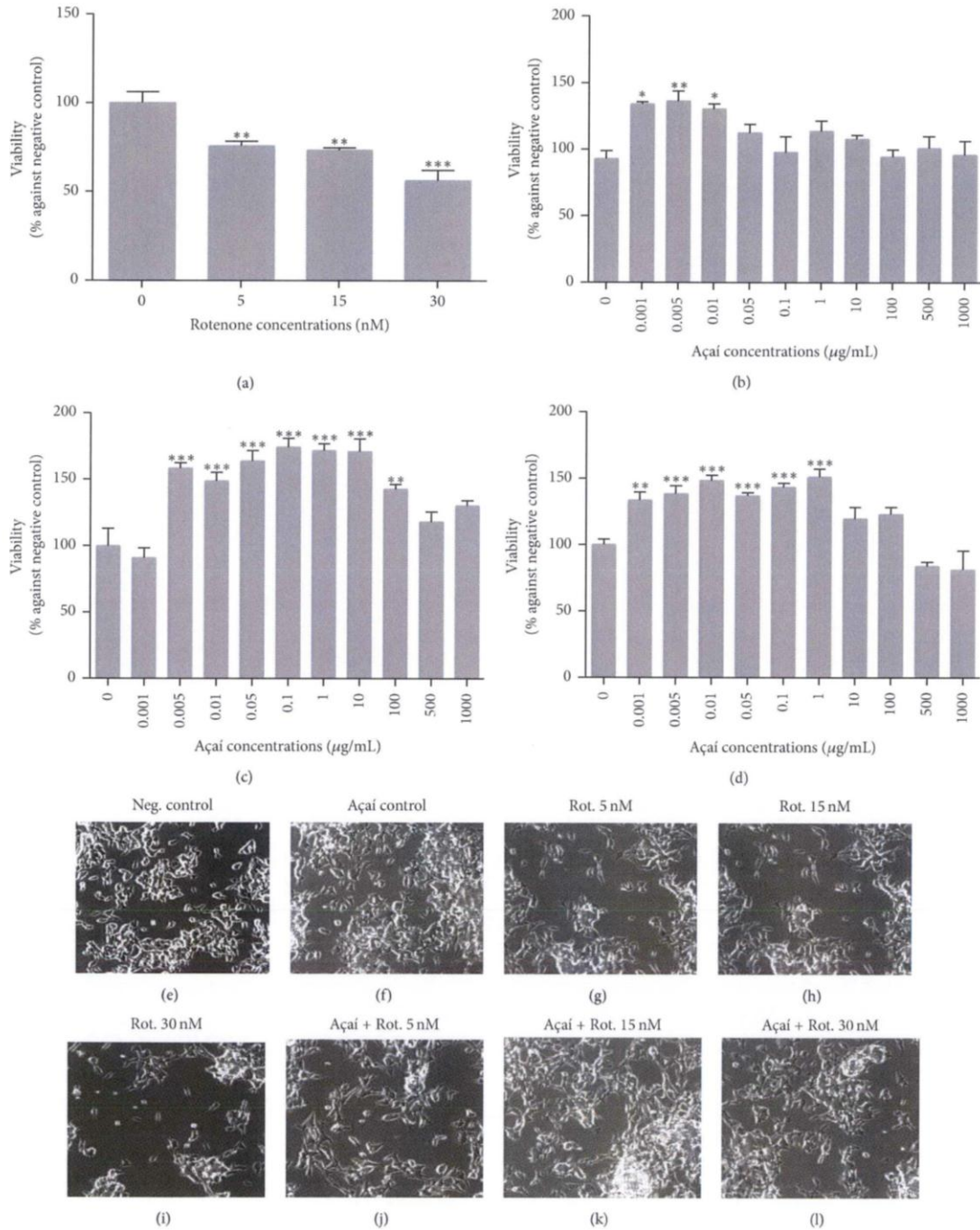


FIGURE 2: Continued.

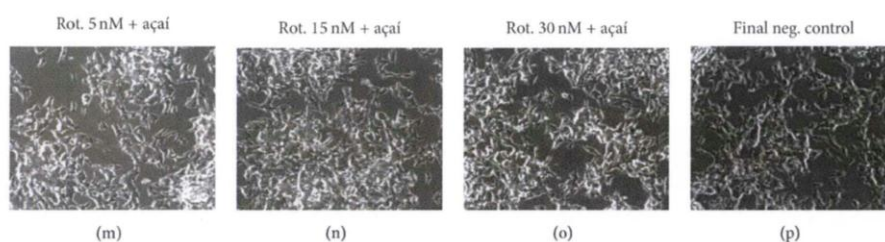


FIGURE 2: Cell viability measurements. (a) SH-SY5Y cells exposure to 5, 15, and 30 nM of rotenone during 24 h showing significant cell mortality for all concentrations; (b, c, and d) SH-SY5Y cells exposure to different concentrations of açai freeze-dried hydroalcoholic extract during 24, 48, and 72 h showing a hormetic cell response; (e–p) microscopic scanning of SH-SY5Y cells exposure to rotenone and/or açai freeze-dried hydroalcoholic extract (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showing the cytotoxic effect of rotenone and the protective action of açai freeze-dried hydroalcoholic extract. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

5 and 15 nM (Figure 3(a)) and reversing those of 15 and 30 nM (Figure 3(b)). On the other hand, we observed the opposite response for mitochondrial complexes II and III under rotenone treatments and in this case, açai freeze-dried hydroalcoholic extract proved to cause protein expression in similar conditions to the negative control at 15 and 30 nM of rotenone for both experimental designs (Figures 3(c), 3(d), 3(e), and 3(f)). No significant results were observed for mitochondrial complexes IV and V (Figures 3(g), 3(h), 3(i), and 3(j)).

Mitochondrial complex I enzyme activity presented a decreased dose-dependent activity under rotenone treatments and an increased enzyme action under açai exposure. Açai proved to be able to improve the enzyme activity of this complex under preventative and reverse conditions, especially before and after rotenone 15 nM (Figures 3(k) and 3(l)).

Açai freeze-dried hydroalcoholic extract modulated NDUFS7, NDUFS8, and NDUFV2 protein expression differently, as shown in Figure 4. Rotenone significantly decreased all the subunits tested in this study at all concentrations unless NDUFV1. On the other hand, açai extract improved protein expression tested in at least one design of the experiment and in one concentration of rotenone for NDUFS7, NDUFS8, and NDUFV2. qRT-PCR for those mitochondrial complex I subunits showed a similar profile for gene and protein expression for NDUFS7 and NDUFS8 (Figures 4(i), 4(j), 4(k), and 4(l)); however, açai extract modified gene expression differently to protein expression finds, with significant improvements in gene expression for NDUFV1 (Figures 4(m) and 4(n)), which was not observed with western blot analysis.

While rotenone treatments increased ROS total levels at SH-SY5Y cells in a dose-dependent way, açai freeze-dried hydroalcoholic extract at 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  considerably reduced ROS production for all rotenone concentrations in both experimental designs (Figures 5(a) and 5(b)), showing important antioxidant activity. As a consequence of oxidative stress, rotenone also increased lipid peroxidation tested by TBARS assay; however, as previously expected açai freeze-dried hydroalcoholic extract was also able to decrease lipid peroxidation rates in both experimental designs (Figures 5(c)

and 4(d)), normalizing this imbalance compared to rotenone concentrations and negative control.

#### 4. Discussion

The present *in vitro* study described the important protective effects of açai in neuronal-like SH-SY5Y cells exposed to rotenone that caused mitochondrial dopaminergic dysfunction. The açai protection involved a reversion of mitochondrial complex I dysfunction and oxidative stress caused by rotenone (Figure 6).

It is currently known that BD is associated with mitochondrial dysfunction, especially at complex I, and this abnormality has several cell oxidative consequences [8, 9, 44]. Since the pharmacotherapy used for BD is neither fully effective nor safe, it is a necessity to search for new alternative therapies. The results described here indicate that the chemical matrix found in açai fruit could be a potential candidate for improving the function of mitochondrial complex I and subsequently improving neuropsychiatric BD symptoms [21–23].

Açai freeze-dried hydroalcoholic extract showed the presence of different important compounds with known biological effects, mainly orientin, *p*-coumaric acid, and apigenin. Orientin is known to be an important phenolic compound found in different fruits. This molecule has significant antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective effects [45–48]. In a study performed by An et al. [49], orientin demonstrated significant antioxidant activity and neural ultrastructure improvement in aged mice. The *p*-coumaric acid is another phenolic compound with considerable antioxidant capacity [50]; however, apigenin also demonstrates antioxidant activity as an important neuroprotective competence due to its ability to cross the blood-brain barrier [51]. Previous studies have shown that apigenin has no toxic effects, even at high doses [52].

It is still unknown whether açai could cross the blood-brain barrier by itself; however, there are some studies describing its neuroprotective effects. In work developed by Poulouse et al. [24], for example, açai was able to attenuate calcium dysregulation in rodent brain cells and to modulate



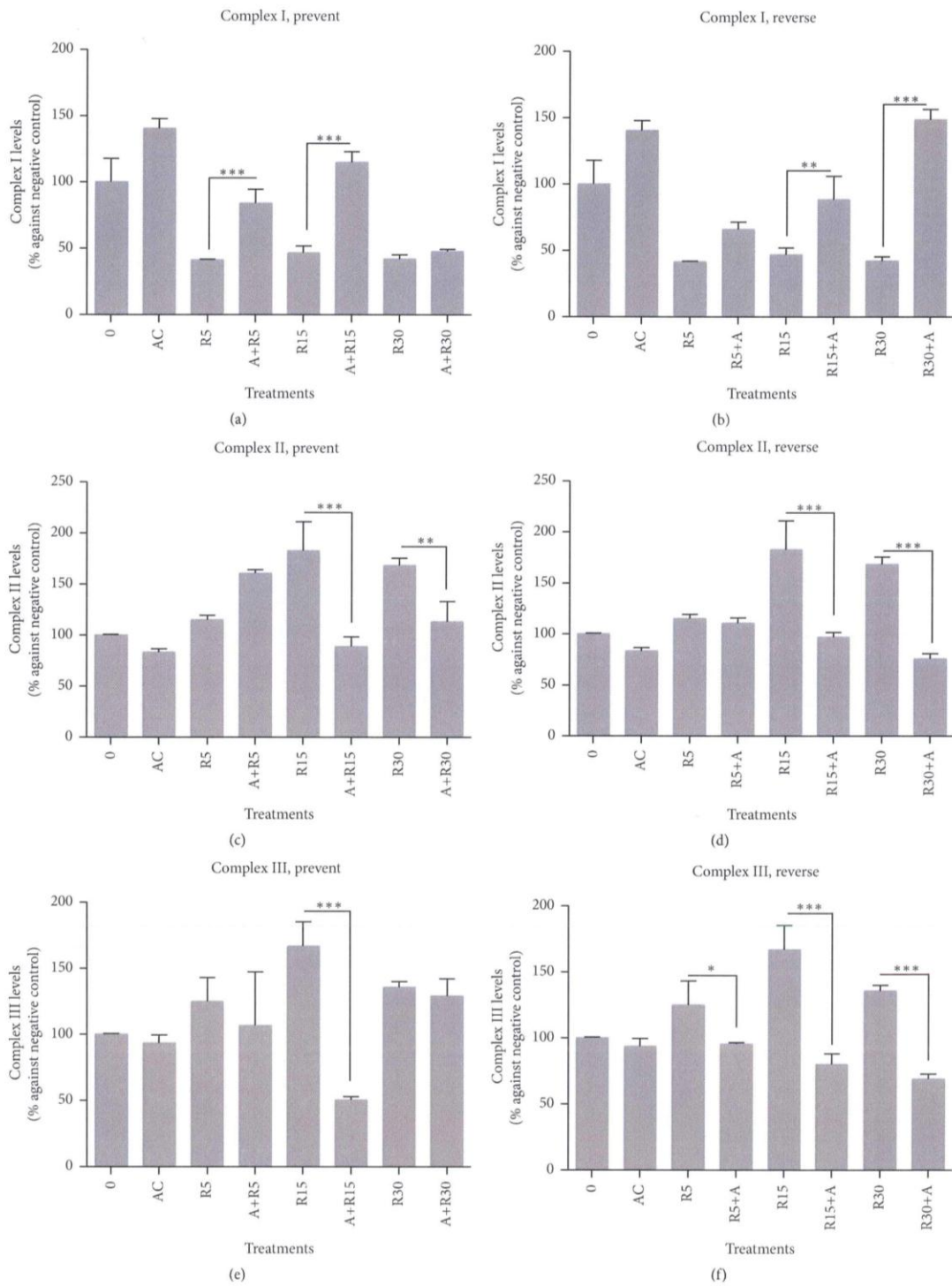


FIGURE 3: CONTINUED.

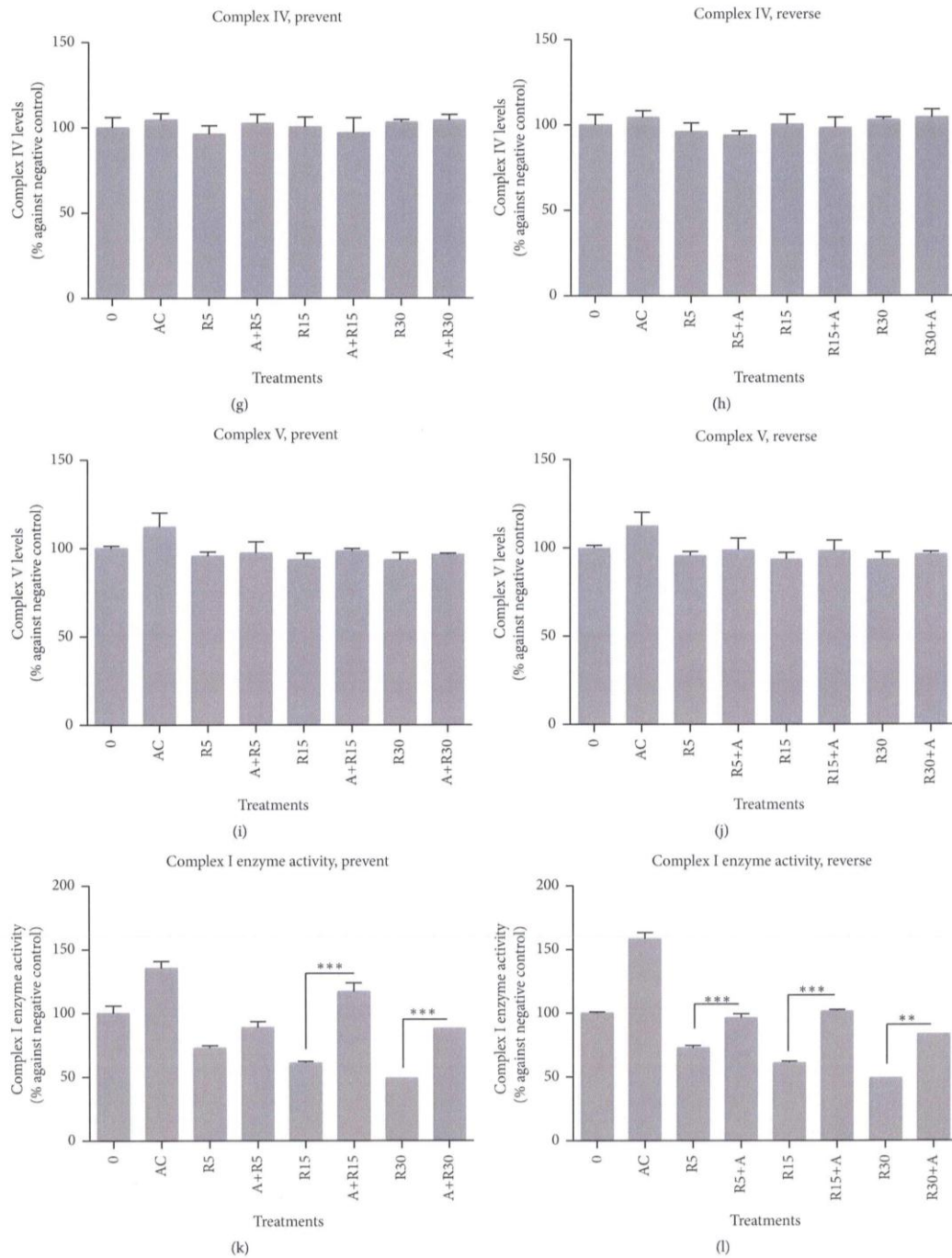


FIGURE 3: Cellular oxidative phosphorylation pathway measurements. (a–j) Rotenone exposition decreased mitochondrial complex I and increased mitochondrial complexes II and III, and açai freeze-dried hydroalcoholic extract normalized the protein expressions. (k and l) Rotenone decreased mitochondrial complex I enzyme activity and açai freeze-dried hydroalcoholic extract was able to increase enzyme activity in both designs of experiment. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

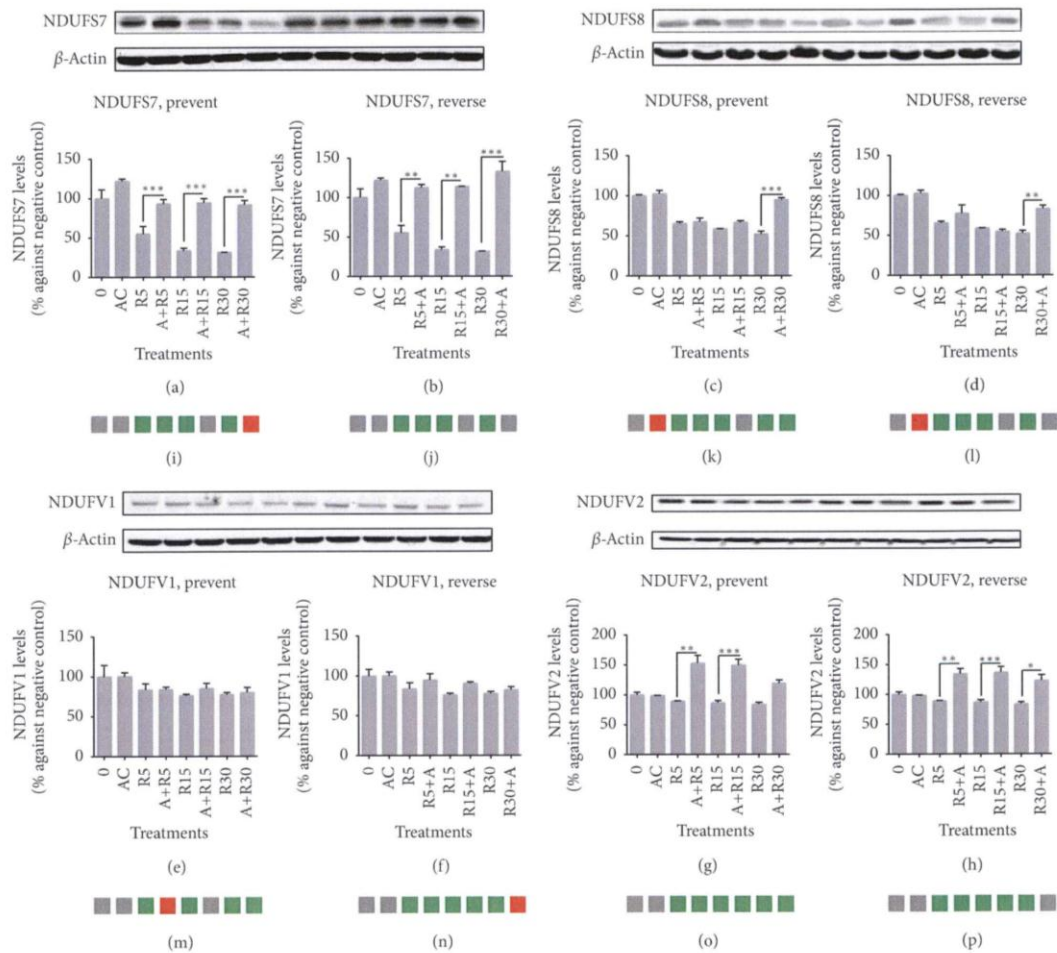


FIGURE 4: Mitochondrial complex I subunits analysis by western blot and qRT-PCR assays. The order of treatment for all the blot images: 0, Rot. 5, Rot. 15, Rot. 30, A+R5, A+R15, A+R30, R5+A, R15+A, and R30+A; (a and b) NDUF7 protein expression analysis; (c and d) NDUF8 protein expression analysis; (e and f) NDUFV1 protein expression analysis; (g and h) NDUFV2 protein expression analysis. Gene expression analysis follows the same graph order where gray means normal gene expression, green means downregulation gene expression, and red means upregulation gene expression. (i and j) NDUF7 gene expression analysis; (k and l) NDUF8 gene expression analysis; (m and n) NDUFV1 gene expression analysis; (o and p) NDUFV2 gene expression analysis. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

cell autophagy. Moreover, it is already known that different bioactive compounds, especially flavonoids, can cross the blood-brain barrier [53–55]. In this sense, considering that the chemical matrix of açai is composed of different flavonoids, perhaps these molecules are able to reach the brain. It is necessary to perform *in vivo* studies to test this hypothesis.

As expected, rotenone decreased SH-SY5Y cell viability in a dose-responsive way as a cytotoxic effect of this chemical, corroborating the finds of Kim et al. [41]. Açai freeze-dried hydroalcoholic extract increased cell viability measured by XTT assay in a hormetic response. The best rate of cell proliferation was observed at 48 h of incubation and the EC50 for

this period of exposition was 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In a study performed by Wong et al. [56] using rat pheochromocytoma cells, açai freeze-dried hydroalcoholic extract showed significant neuronal protection against beta-amyloid peptide exposure, increasing cell viability, especially at 5 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of açai freeze-dried hydroalcoholic extract, also supporting our finds.

Rotenone is known to be a reagent able to directly inhibit mitochondrial complex I [57]. In a complex I dysfunction the mitochondria electron transport chain will try to maintain energy production by using complexes II and III which explains their protein overexpression found in this study by OXPHOS assay. Proving an affinity between açai freeze-dried

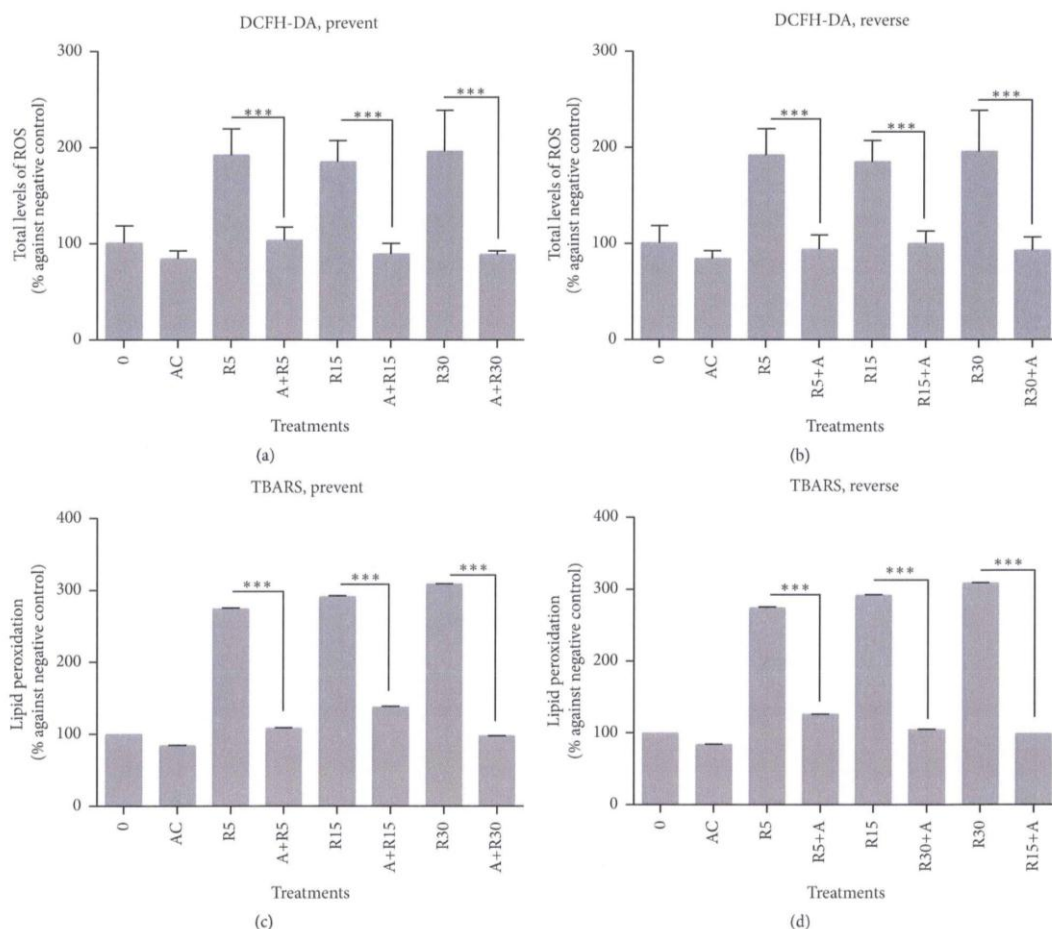


FIGURE 5: Cell oxidative metabolism biomarker measurements. (a and b) Total levels of ROs measured by DCFH-DA assay; (c and d) lipid peroxidation measured by TBARS assay. While rotenone increased ROs levels in a dose-dependent way and also lipid peroxidation, açaí freeze-dried hydroalcoholic extract was able to decrease both biomarkers compared to the negative control. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

hydroalcoholic extract and mitochondrial complex I we also observed the significant effect of our extract against rotenone-induced dysfunction, showing not only a protein expression improvement but also a mitochondrial complex I enzymatic activity enhancement. Açaí 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exposition was able to recover mitochondrial complex II and III protein expression, recovering the mitochondrial electron transport chain function. Our results thus suggest a pharmacological effect of açaí freeze-dried hydroalcoholic extract on mitochondrial complex I.

The effects of açaí on the prevention and reversion of mitochondrial complex I dysfunction have been not associated with other plants or pharmacological drugs. For example, in a study developed with rat E18 cortical neurons, Scola et al. [58] showed that lithium at 0.75 mM was able to increase complex I activity compared to rotenone treatments;

however lithium treatment was unable to recover 100% of the activity of this complex compared to the negative control. Our findings demonstrate that açaí can increase mitochondrial complex I activity under rotenone-induced mitochondrial dysfunction and also recover 100% or more of the complex I activity, compared to the negative control, renormalizing mitochondrial function.

We measured NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, and NDUFV2 protein and gene expression at SH-SY5Y cell after rotenone and/or açaí treatments. The results showed a significant decrease in their expressions with rotenone exposure; however, açaí increased these expressions in some experimental designs and rotenone concentrations. The main complex I subunit in which açaí presented a pharmacological effect of prevention and reversion of rotenone effects was NDUFS7, measured by both western

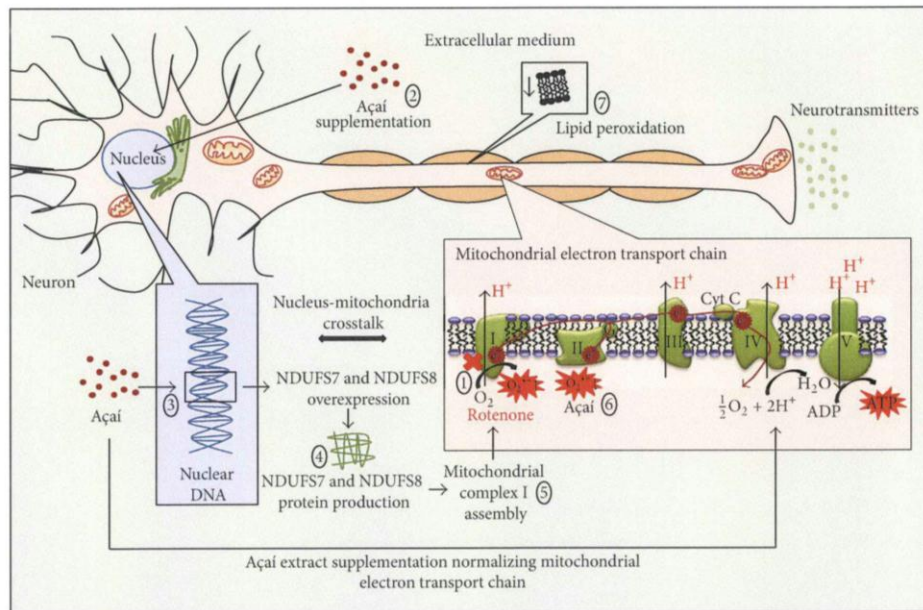


FIGURE 6: Protective effects of açai supplementation in neuron-like cells SH-SY5Y exposed to rotenone. ① Rotenone causing mitochondrial complex I dysfunction, increasing superoxide production, and decreasing ATP synthesis; ② açai freeze-dried hydroalcoholic extract supplementation acting at cell nucleus; ③ açai freeze-dried hydroalcoholic extract increasing NDUFS7 and NDUFS8 gene expression in particular; ④ NDUFS7 and NDUFS8 protein production in response to the gene overexpression; ⑤ mitochondrial complex I assembly by new protein subunits; ⑥ renormalization of the mitochondrial electron transport chain, decreasing the oxidative stress, and normalizing ATP synthesis. ⑦ Decreased lipid peroxidation in consequence of the oxidative metabolism balance recovery.

blot and qRT-PCR. It is already known that rotenone is able to deactivate mitochondrial complex I electron transfer to ubiquinone, meaning mitochondrial complex I Q module (formed by NDUFS7, NDUFS8, NDUFS2, and NDUFS3 subunits) inactivation. Rotenone can also impair complex I transcriptions through direct effects and by induction of the oxidative stress that causes DNA damage and affects the translocation of important transcription factors [58, 59]. Our results showed that açai has the capacity to improve the gene expression of different nuclear genes. It is also already known that açai can modulate the gene expression of antioxidant enzymes, including SOD, CAT, and GPx [58]; however, the way in which açai is able to modulate gene expression positively has not yet been determined. One potential hypothesis is that açai could increase the transcription factor involved in nuclear gene expression located at promoter regions, such as NRF2, by flavone interaction and activation [60]. The results described here suggest that açai freeze-dried hydroalcoholic extract acts mainly at the complex I Q module under mitochondrial dysfunction, especially at the NDUFS7 subunit, and this effect is associated with its gene overexpression.

Although rotenone treatments were able to increase oxidative stress by elevation of ROS production and lipid peroxidation, açai freeze-dried hydroalcoholic extract was able to decrease the levels of both biomarkers for all rotenone

concentrations. These results were found in both experimental designs. We postulate that açai extract can act as an antioxidant agent under mitochondrial complex I deficiency, recovering mitochondrial function and neutralizing cell damage caused by oxidative imbalance.

It is also important to emphasize that açai did not demonstrate any *in vitro* neurotoxic effect in SH-SY5Y cells. *Annona muricata* fruit, for example, has an important neurotoxic effect because of its chemical matrix which includes polyketides specific to Annonaceae. These metabolites are the most potent mitochondrial complex I inhibitor found in nature, inducing neuronal death [61]. Otherwise, in this study, açai modulated positively different cellular aspects preserving neuronal viability.

All the results noted in this study are based on *in vitro* experiments. Due to methodological limitations associated with *in vitro* studies, complementary studies using *in vivo* experimental models need to be performed to confirm the evidence described here.

## 5. Conclusions

There are many studies that describe the different activities of plant extracts; however, the effects of fruits and other functional foods on mitochondrial function have not yet been well evaluated. Our results showed that açai hydroalcoholic

extract has an important affinity to mitochondrial complex I. Açai is able to recover the mitochondrial electron transport chain function of neuronal-like cells under mitochondrial complex I dysfunction mainly through overexpression of important nuclear mitochondrial complex I subunits genes and improvement in their proteomic expression. Our findings suggest that açai freeze-dried hydroalcoholic extract has a significant pharmacological capacity. Açai could be a new alternative for drug development research for neuropsychiatric diseases, as BD, mainly as a result of the isolated chemical matrix of this fruit. It is important to note that all findings described here are limited to *in vitro* studies and they may be confirmed by an *in vivo* experimental model in a future study.

### Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

### Acknowledgments

The authors would like to thank “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” for Brazilian financial support. They also would like to thank Professor Margareth Linde Athayde (*in memoriam*) for her support in extract characterization.

### References

- [1] I. Epstein, I. Szpindel, and M. A. Katzman, “Pharmacological approaches to manage persistent symptoms of major depressive disorder: rationale and therapeutic strategies,” *Psychiatry Research*, vol. 220, supplement 1, pp. S15–S33, 2014.
- [2] M. J. Millan, G. M. Goodwin, A. Meyer-Lindenberg, and S. Ove Ogren, “Learning from the past and looking to the future: emerging perspectives for improving the treatment of psychiatric disorders,” *European Neuropsychopharmacology*, vol. 25, no. 5, pp. 599–656, 2015.
- [3] J. Alonso, M. Petukhova, G. Vilagut et al., “Days out of role due to common physical and mental conditions: results from the WHO World Mental Health surveys,” *Molecular Psychiatry*, vol. 16, no. 12, pp. 1234–1246, 2011.
- [4] I. Grande, M. Berk, B. Birmaher, and E. Vieta, “Bipolar disorder,” *The Lancet*, vol. 387, no. 10027, pp. 1561–1572, 2016.
- [5] N. Craddock and P. Sklar, “Genetics of bipolar disorder,” *The Lancet*, vol. 381, no. 9878, pp. 1654–1662, 2013.
- [6] H. B. Clay, S. Sullivan, and C. Konradi, “Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia,” *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 29, no. 3, pp. 311–324, 2011.
- [7] H. Manji, T. Kato, N. A. Di Prospero et al., “Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 13, no. 5, pp. 293–307, 2012.
- [8] G. Scola, H. K. Kim, L. T. Young, and A. C. Andreazza, “A fresh look at complex I in microarray data: clues to understanding disease-specific mitochondrial alterations in bipolar disorder,” *Biological Psychiatry*, vol. 73, no. 2, pp. e4–e5, 2013.
- [9] A. C. Andreazza, L. Shoo, J.-F. Wang, and L. Trevor Young, “Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder,” *Archives of General Psychiatry*, vol. 67, no. 4, pp. 360–368, 2010.
- [10] M. Berk, F. Kapczinski, A. C. Andreazza et al., “Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors,” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 35, no. 3, pp. 804–817, 2011.
- [11] S. Akarsu, D. Torun, A. Bolu et al., “Mitochondrial complex I and III gene mRNA levels in schizophrenia, and their relationship with clinical features,” *Journal of Molecular Psychiatry*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [12] M. F. Beal, “Oxidatively modified proteins in aging and disease,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 32, no. 9, pp. 797–803, 2002.
- [13] G. Curran and A. Ravindran, “Lithium for bipolar disorder: a review of the recent literature,” *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 14, no. 9, pp. 1079–1098, 2014.
- [14] H. Grunze, E. Vieta, G. M. Goodwin et al., “The World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for the biological treatment of bipolar disorders: update 2010 on the treatment of acute bipolar depression,” *The World Journal of Biological Psychiatry*, vol. 11, no. 2, pp. 81–109, 2010.
- [15] G. M. Goodwin, “Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder: revised second edition—recommendations from the British association for psychopharmacology,” *Journal of Psychopharmacology*, vol. 23, no. 4, pp. 346–388, 2009.
- [16] L. Hou, N. Xiong, L. Liu et al., “Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via autophagy enhancement,” *BMC Neuroscience*, vol. 16, article 82, 2015.
- [17] J. Kleiner, L. Altshuler, V. Hendrick, and J. M. Hershman, “Lithium-induced subclinical hypothyroidism: review of the literature and guidelines for treatment,” *The Journal of Clinical Psychiatry*, vol. 60, no. 4, pp. 249–255, 1999.
- [18] G. S. Markowitz, J. Radhakrishnan, N. Kambham, A. M. Valeri, W. H. Hines, and V. D. D’Agati, “Lithium nephrotoxicity: a progressive combined glomerular and tubulointerstitial nephropathy,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 11, no. 8, pp. 1439–1448, 2000.
- [19] A. H. Young and J. I. Newham, “Lithium in maintenance therapy for bipolar disorder,” *Journal of Psychopharmacology*, vol. 20, no. 2, pp. 17–22, 2006.
- [20] J. Kang, K. M. Thakali, C. Xie et al., “Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart.,” *Food Chemistry*, vol. 133, no. 3, pp. 671–677, 2012.
- [21] G. S. Jensen, X. Wu, K. M. Patterson et al., “In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 18, pp. 8326–8333, 2008.
- [22] S. M. Poulouse, D. F. Bielinski, A. Carey, A. G. Schauss, and B. Shukitt-Hale, “Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with açai-enriched diets,” *Nutritional Neuroscience*, 2016.
- [23] X. Sun, J. Seeberger, T. Alberico et al., “Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet,” *Experimental Gerontology*, vol. 45, no. 3, pp. 243–251, 2010.

- [24] S. M. Poulouse, D. R. Fisher, D. F. Bielinski et al., "Restoration of stressor-induced calcium dysregulation and autophagy inhibition by polyphenol-rich açai (*Euterpe* spp.) fruit pulp extracts in rodent brain cells invitro," *Nutrition*, vol. 30, no. 7-8, pp. 853–862, 2014.
- [25] A. N. Carey, M. G. Miller, D. R. Fisher et al., "Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells," *Nutritional Neuroscience*, 2015.
- [26] S. M. Poulouse, D. R. Fisher, J. Larson et al., "Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 4, pp. 1084–1093, 2012.
- [27] Y. A. Odendaal and A. G. Schauss, "Potent antioxidant and anti-inflammatory flavonoids in the nutrient-rich Amazonian palm fruit, açai (*Euterpe* spp.)," in *Polyphenols in Human Health and Disease*, R. R. Watson, V. R. Reedy, and S. Zibadi, Eds., pp. 219–239, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 2014.
- [28] I. Solanki, P. Parihar, and M. S. Parihar, "Neurodegenerative diseases: from available treatments to prospective herbal therapy," *Neurochemistry International*, vol. 95, pp. 100–108, 2016.
- [29] A. G. Schauss, X. Wu, R. L. Prior et al., "Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 22, pp. 8604–8610, 2006.
- [30] A. G. Schauss, X. Wu, R. L. Prior et al., "Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 22, pp. 8598–8603, 2006.
- [31] A. García-Lafuente, E. Guillaumon, A. Villares, M. A. Rostagno, and J. A. Martínez, "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease," *Inflammation Research*, vol. 58, no. 9, pp. 537–552, 2009.
- [32] J. González-Gallego, S. Sánchez-Campos, and M. J. Tuñón, "Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids," *Nutricion Hospitalaria*, vol. 22, no. 3, pp. 287–293, 2007.
- [33] C. Xie, J. Kang, Z. Li et al., "The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 23, no. 9, pp. 1184–1191, 2012.
- [34] C. Nicholas, S. Batra, M. A. Vargo et al., "Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- $\kappa$ B through the suppression of p65 phosphorylation," *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 10, pp. 7121–7127, 2007.
- [35] L. Zhao, J.-L. Wang, R. Liu, X.-X. Li, J.-F. Li, and L. Zhang, "Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model," *Molecules*, vol. 18, no. 8, pp. 9949–9965, 2013.
- [36] S. P. Patil, P. D. Jain, J. S. Sancheti, P. J. Ghumatkar, R. Tambe, and S. Sathaye, "Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice," *Neuropharmacology*, vol. 86, pp. 192–202, 2014.
- [37] M. Cai, Y. Ma, W. Zhang et al., "Apigenin-7-O- $\beta$ -D-(6"-p-coumaroyl)-glucopyranoside treatment elicits neuroprotective effect against experimental ischemic stroke," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 12, no. 1, pp. 42–52, 2016.
- [38] K. Yamagata, T. Kitazawa, M. Shinoda, C. Tagawa, M. Chino, and H. Matsufuji, "Stroke status evoked adhesion molecule genetic alterations in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and the apigenin inhibition of their expression," *Stroke Research and Treatment*, vol. 2010, Article ID 386389, 11 pages, 2010.
- [39] C. V. Klimaczewski, R. D. A. Saraiva, D. H. Roos et al., "Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)-citrate in rat liver mitochondria in vitro," *Industrial Crops and Products*, vol. 54, pp. 240–247, 2014.
- [40] S. R. Abbas, S. M. Sabir, S. D. Ahmad, A. A. Boligon, and M. L. Athayde, "Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*)," *Food Chemistry*, vol. 147, pp. 10–16, 2014.
- [41] H. K. Kim, K. M. Mendonça, P. A. Howson, J. M. Brotchie, and A. C. Andreazza, "The link between mitochondrial complex I and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y cells—the potential of JNX1001 as a therapeutic agent," *European Journal of Pharmacology*, vol. 764, pp. 379–384, 2015.
- [42] A. C. Andreazza, J.-F. Wang, F. Salmasi, L. Shao, and L. T. Young, "Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder," *Journal of Neurochemistry*, vol. 127, no. 4, pp. 552–561, 2013.
- [43] F. Costa, E. Dornelles, M. F. Mânica-Cattani et al., "Influence of Vall6Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 24, no. 4, pp. 474–481, 2012.
- [44] M. Mimaki, X. Wang, M. McKenzie, D. R. Thorburn, and M. T. Ryan, "Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease," *Biochimica et Biophysica Acta—Bioenergetics*, vol. 1817, no. 6, pp. 851–862, 2012.
- [45] M. Brazier-Hicks, K. M. Evans, M. C. Gershter, H. Puschmann, P. G. Steel, and R. Edwards, "The C-glycosylation of flavonoids in cereals," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 27, pp. 17926–17934, 2009.
- [46] B. N. T. Law, A. P. K. Ling, R. Y. Koh, S. M. Chye, and Y. P. Wong, "Neuroprotective effects of orientin on hydrogen peroxide induced apoptosis in SHSY5Y cells," *Molecular Medicine Reports*, vol. 9, no. 3, pp. 947–954, 2014.
- [47] M. J. Simirgiotis, G. Schmeda-Hirschmann, J. Bórquez, and E. J. Kennelly, "The Passiflora tripartita (banana passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS," *Molecules*, vol. 18, no. 2, pp. 1672–1692, 2013.
- [48] H. Yoo, S.-K. Ku, T. Lee, and J.-S. Bae, "Orientin inhibits HMGB1-induced inflammatory responses in HUVECs and in murine polymicrobial sepsis," *Inflammation*, vol. 37, no. 5, pp. 1705–1717, 2014.
- [49] F. An, G. D. Yang, J. M. Tian, and S. H. Wang, "Antioxidant effects of the orientin and vitexin in trolilus chinensis bunge in D-galactose-aged mice," *Neural Regeneration Research*, vol. 7, no. 33, pp. 2565–2575, 2012.
- [50] S. Mathew, T. E. Abraham, and Z. A. Zakaria, "Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 9, pp. 5790–5798, 2015.
- [51] M. Popović, M. Caballero-Bleda, O. Benavente-García, and J. Castillo, "The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats," *Journal of Psychopharmacology*, vol. 28, no. 5, pp. 498–501, 2014.
- [52] P. C. H. Hollman and M. B. Katan, "Health effects and bioavailability of dietary flavonols," *Free Radical Research*, vol. 31, pp. S75–S80, 1999.

- [53] H. van Praag, M. J. Lucero, G. W. Yeo et al., "Plant-derived flavanol (–)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice," *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 22, pp. 5869–5878, 2007.
- [54] L. Rangel-Ordóñez, M. Nöldner, M. Schubert-Zsilavecz, and M. Wurglics, "Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba extract EGb 761®," *Planta Medica*, vol. 76, no. 15, pp. 1683–1690, 2010.
- [55] P. E. Milbury and W. Kalt, "Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood-brain barrier," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 7, pp. 3950–3956, 2010.
- [56] D. Y. S. Wong, I. F. Musgrave, B. S. Harvey, and S. D. Smid, "Açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against  $\beta$ -amyloid exposure in vitro," *Neuroscience Letters*, vol. 556, pp. 221–226, 2013.
- [57] B. Halliwell, "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment," *Drugs and Aging*, vol. 18, no. 9, pp. 685–716, 2001.
- [58] G. Scola, H. K. Kim, L. T. Young, M. Salvador, and A. C. Andreazza, "Lithium reduces the effects of rotenone-induced complex I dysfunction on DNA methylation and hydroxymethylation in rat cortical primary neurons," *Psychopharmacology*, vol. 231, no. 21, pp. 4189–4198, 2014.
- [59] J. F. D. C. Guerra, C. L. D. B. Magalhães, D. C. Costa, M. E. Silva, and M. L. Pedrosa, "Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 49, no. 3, pp. 188–194, 2011.
- [60] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, and C. Giovannini, "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 16, no. 10, pp. 577–586, 2005.
- [61] A. Lannuzel, G. U. Höglinger, P. Champy, P. P. Michel, E. C. Hirsch, and M. Ruberg, "Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae?" *Journal of Neural Transmission*, vol. 2006, no. 70, pp. 153–157, 2006.
-



The Scientific World Journal

Gastroenterology Research and Practice

MEDIATORS OF INFLAMMATION

Journal of Diabetes Research

Disease Markers

Journal of Immunology Research

International Journal of Endocrinology

PPAR Research

BioMed Research International

Journal of Ophthalmology

Stem Cells International

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Journal of Obesity

Journal of Oncology

Computational and Mathematical Methods in Medicine

Behavioural Neurology

Parkinson's Disease

AIDS Research and Treatment

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



### **Manuscript 3**

Anti-inflammatory potential of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) via NLRP3 modulation in PHA-induced RAW 264.7 macrophages





1 **Anti-inflammatory potential of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) via**  
2 **NLRP3 modulation in PHA-induced RAW 264.7 macrophages**

3  
4 **Alencar Kolinski Machado<sup>1,4</sup>; Francine Carla Cadoná<sup>2,4</sup>; Charles Elias**  
5 **Assmann<sup>2,4</sup>; Ana Cristina Andreazza<sup>6,7</sup>; Marta Maria Medeiros Frescura**  
6 **Duarte<sup>1,4</sup>; Thiago Duarte<sup>1,4</sup>; Euler Esteves Ribeiro<sup>4,5</sup>; Anju Philip<sup>8</sup>; Xiao-Yan**  
7 **Wen<sup>8</sup>; Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,2,3,4</sup>**

8  
9 <sup>1</sup>Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa  
10 Maria-RS, Brazil

11 <sup>2</sup>Postgraduate program of Biological Sciences: Toxicology Biochemistry, Federal  
12 University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

13 <sup>3</sup>Postgraduate program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa  
14 Maria-RS, Brazil

15 <sup>4</sup>Biogenomics Laboratory, Department of Morphology, Health Science Center, Federal  
16 University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

17 <sup>5</sup>Third Age Open University, University of Amazonas State, Manaus-AM, Brazil

18 <sup>6</sup>Department of Psychiatry, University of Toronto, Toronto-ON, Canada

19 <sup>7</sup>Centre for Addiction and Mental Health, Toronto-ON, Canada

20 <sup>8</sup> Department of Physiology, University of Toronto, Toronto-ON, Canada

21 [alencarkolinski@gmail.com](mailto:alencarkolinski@gmail.com)

22 [fran.cine.bio@hotmail.com](mailto:fran.cine.bio@hotmail.com)

23 [charles.ufsm@gmail.com](mailto:charles.ufsm@gmail.com)

24 [ana.andreazza@utoronto.ca](mailto:ana.andreazza@utoronto.ca)

25 [duartmm@hotmail.com](mailto:duartmm@hotmail.com)

26 [duartethiago89@yahoo.com.br](mailto:duartethiago89@yahoo.com.br)

27 [unatieuler@gmail.com](mailto:unatieuler@gmail.com)

28 [Philipa@smh.ca](mailto:Philipa@smh.ca)

29 [wenx@smh.ca](mailto:wenx@smh.ca)

30 [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

31  
32 **Corresponding author:** Ivana Beatrice Mânica da Cruz

33 E-mail: [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

34 Address: Roraima Avenue, 1000. Building #19, suite 3101/3102. Santa Maria – RS –  
35 Brazil. Zipcode: 97105-900.

36 **Abstract**

37

38 Inflammatory response is an important process responsible for ensuring the  
39 organism integrity and homeostasis. Several diseases are associated with  
40 uncontrolled inflammation and oxidative stress. Previous studies reported that  
41 cellular oxidative stress could be associated with inflammatory system  
42 activation acting as a pro-inflammatory mediator through nod-like receptor protein  
43 containing 3 (NLRP3)-inflammasome overexpression. However, currently  
44 treatments for these conditions lead to side effects and difficult disease  
45 control. For this reason, new therapies development using natural products  
46 have been studied. In this sense, açai (*Euterpe oleracea* Mart.), a native fruit from  
47 Amazon, is a potential candidate in this field, since there are several studies  
48 reporting its antioxidant and anti-inflammatory properties, however, açai  
49 mechanism of action in inflammation process is unclear yet. In this context, we  
50 evaluated the *in vitro* anti-inflammatory activity and causal mechanism of  
51 freeze-dried açai hydroalcoholic extract on murine RAW 264.7 macrophages  
52 phytohemagglutinin (PHA)-induced. RAW 264.7 cells inflammation activated by  
53 PHA (1 $\mu$ L/50 $\mu$ L; v:v) were exposed to different concentrations of açai extract  
54 (0.001-1000  $\mu$ g/mL) during 72 hours. Oxidative-inflammatory parameters were  
55 evaluated by colorimetric, fluorometric and molecular assays. Our findings  
56 revealed that açai extract presented anti-inflammatory effect under PHA-  
57 induced RAW 264.7 macrophages. Also, the results suggested that açai acts  
58 reducing macrophages proliferation through cell cycle arresting due to reduced  
59 NLRP3-inflammasome activation in response to oxidative metabolism  
60 recovering. According to these findings, açai could be used to develop new  
61 studies for drug development, since this fruit has a chemical matrix composed  
62 by several functional bioactive molecules.

63

64 **Keywords:** açai (*Euterpe oleracea* Mart.), inflammation, oxidative stress,  
65 (NLRP3)-inflammasome, RAW 264.7 macrophage.

66

67

68

69

70

71

72

73

## 74 **Introduction**

75

76 Inflammatory response is an important way of protection against  
77 pathogenic agents or situations that can change cellular physiology and this  
78 process might be controlled [1,2]. In some cases, chronic inflammatory patterns  
79 are established in the body, being associated with, for example,  
80 neuropsychiatric illness, as schizophrenia and bipolar disorder (BD) [1,3–6]. It  
81 is already known that mitochondrial complex I dysfunction has been associated  
82 with BD progression, causing cellular oxidative imbalance due to reduction of  
83 ATP synthesis and increased production of superoxide anion, and subsequent  
84 others reactive oxygen species (ROS). Under this oxidative stress condition,  
85 cells can present several alterations, including lipid peroxidation, protein  
86 oxidation, and DNA damage [6,7], as well as ROS produced by mitochondrial  
87 dysfunction can be considered as a damage-associated molecular pattern  
88 (DAMPs) agent establishing chronic inflammation at central nervous system  
89 (CNS) and peripheral immune cells of subjects with BD, since elevated ROS  
90 levels could trigger inflammasome complex [8–10].

91 Nod-like receptor pyrin containing 3 (NLRP3) is an molecular protein  
92 complex inflammasome that has been described as a redox sensor and  
93 possible link between cellular oxidative imbalance and inflammatory chronic  
94 response at subjects with BD, for example [9–11]. This molecular protein  
95 complex is produced at high ROS levels, which leads to overexpression of  
96 NLRP3 and migration from cytoplasm to damaged mitochondria [9,12,13].  
97 Subsequently, NLRP3-inflammasome trigger interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production  
98 from an inactive precursor (pro-IL-1), that is cleaved by caspase 1. IL-1 is

99 considered an master mediator which increases lymphocytes and macrophages  
100 proliferation, and induces higher levels of other pro-inflammatory cytokines,  
101 such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interferon-  
102 gamma (INF- $\gamma$ ) [14]. Therefore, inflammasome induces an inflammatory  
103 response specially by M1 macrophages, and this process is concluded by M2  
104 macrophages anti-inflammatory cytokines production allowing tissue  
105 regeneration and cellular homeostasis recovering [15,16].

106 In this sense, Sorbara & Girardin [17] described that mitochondrial  
107 dysfunction may fuel to inflammasome activation. Some investigations as  
108 performed by Kim et al [10] suggested NLRP3-inflammasome as possible link  
109 between these two most commonly reported modifications in this  
110 neuropsychiatric illness. This suggestion was based in results obtained from  
111 analysis of post-mortem frontal cortex samples from patients with BD. As the  
112 oxidative stress is caused by mitochondrial complex I dysfunction is subjects  
113 with BD, it is not possible to reduce basal ROS production. Unfortunately, the  
114 administration of anti-inflammatory drugs could not be efficient to eliminate  
115 chronic-inflammation observed in these patients. In this case, the use of  
116 supplements with concomitant antioxidant and anti-inflammatory activities could  
117 be useful.

118 Evidences showed that several fruits present many potential anti-  
119 inflammatory molecules, which could act in interaction with other bioactive  
120 compounds with antioxidant properties [18]. This is the case of açai (*Euterpe*  
121 *oleracea* Mart.), an Amazonian fruit considered a functional food widely used in  
122 the world, which presents several bioactive molecules at its chemical matrix,  
123 such as orientin, isoorientin, apigenin, vanillic acid, anthocyanins, cyanidin-3-



124 glucoside and cyanidin-3-rutinoside [19,20]. Ford et al [21] suggested that  
125 (poly)phenols from natural products, as açai berry, are able to reduce pro-  
126 inflammatory mediators from human lymphocytes, being a potential alternative  
127 for patients under chronic-inflammation risk.

128 In a previous study, Machado et al [20] showed that açai hydroalcoholic  
129 extract could potentially protect neural-like cells (SH-SY5Y) against  
130 mitochondrial complex I dysfunctions caused by rotenone exposure, which is  
131 used to produce an *in vitro* experimental model for neuropsychiatric diseases.  
132 Moreover, this study showed that açai was able to modulate mitochondrial  
133 complex I subunits gene expression and decrease ROS levels of neural-like  
134 cells. Therefore, we developed a cellular *in vitro* study using freeze-dried  
135 hydroalcoholic açai extract on activated murine RAW 264.7 macrophages  
136 evaluating its effect on initial inflammatory cascade via NLRP3 inflammasome  
137 modulation and in the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines  
138 production.

139

## 140 **Materials and Methods**

141

### 142 **Freeze-dried hydroalcoholic *Euterpe oleracea* (Açai) extract preparation** 143 **and chemical characterization**

144

145 The freeze-dried hydroalcoholic açai extract (açai extract) used in this  
146 study was previously obtained and characterized by Machado et al [20]. Briefly,  
147 açai fresh fruits were obtained from a harvesting area of Manaus city,  
148 Amazonas state, Brazil. Fruits were transported to the Biogenomics Laboratory

149 at the Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil,  
150 under -20°C in a dry environment to keep all fruit's quality and properties. First  
151 of all, fruits were confirmed to be *Euterpe oleracea* Mart. by a specialist in plant  
152 ecology and botany. Then, açai fruits were macerated manually and the pulp  
153 and peel were used to prepare the hydroalcoholic extract. A freeze-dried  
154 hydroalcoholic extract was made following the instructions described by  
155 Machado et al [20].

156 After açai extract preparation, the chemical matrix was determined by  
157 high performance liquid chromatography (HPLC-DAD), where the following  
158 chemical molecules were detected: orientin ( $8.05 \pm 0.03$  mg/g), *p*-coumaric acid  
159 ( $3.52 \pm 0.01$  mg/g), apigenin ( $3.49 \pm 0.01$  mg/g), cyanidyn ( $2.62 \pm 0.01$  mg/g),  
160 luteolin ( $2.57 \pm 0.02$  mg/g), epicatechin ( $2.37 \pm 0.02$  mg/g), vitexin ( $2.19 \pm 0.01$   
161 mg/g), chrysin ( $1.83 \pm 0.01$  mg/g), caffeic acid ( $0.76 \pm 0.01$  mg/g), catechin  
162 ( $0.75 \pm 0.03$  mg/g), gallic acid ( $0.73 \pm 0.01$  mg/g), chlorogenic acid ( $0.41 \pm 0.01$   
163 mg/g).

164

## 165 **Cell culture and treatments**

166

167 Macrophages cell line RAW 264.7 purchased from the American Type  
168 Culture Collection (ATCC® TIB-71™, Manassas, VA, USA) were cultured in  
169 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® Thermo Fisher - 11965-  
170 092; Waltham, MA, USA) with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco®  
171 Thermo Fisher – 12484028; Waltham, MA, USA) and supplemented with 1% of  
172 antibiotic (100U/mL penicillin; 100mg/mL streptomycin) (Gibco® Thermo Fisher  
173 – 15140122; Waltham, MA, USA). Cells were cultured at 37°C in a humid

174 environment with 5% CO<sub>2</sub> until ideal cell number and confluence of 90% to  
175 perform all the experiments.

176 All the treatments performed in this study were conducted to evaluate the  
177 anti-inflammatory effect and the action mechanism of açai extract at the  
178 macrophage cell concentration of 2X10<sup>5</sup> cells/mL. Initially cells between  
179 passage number 5 to 10 were plated at 96-well plate and after 24h of  
180 stabilization, cell were treated with phytohemagglutinin (PHA) (Sigma-Aldrich –  
181 L9132; St. Louis, MO, USA) (1µL/50µL; v:v). PHA is a lectin found in plants,  
182 especially legumes which trigger mitosis and affects the cell membrane in  
183 regard to transport and permeability of proteins, activating at mononuclear cells,  
184 including macrophages, as a DAMP agent. Therefore, this antigen can be used  
185 to simulate sterile inflammatory response [22]. After PHA exposition, cells were  
186 treated with different concentrations of açai extract (0.001-1000 µg/mL) during  
187 72 hours at optimal cell culture conditions. The dose-response curve was used  
188 to determine the most effective concentration of açai extract with anti-  
189 inflammatory activity by different colorimetric, fluorescent, and enzymatic  
190 experimental assays.

191

## 192 **Experimental assays**

193

### 194 **Cell proliferation analysis**

195

196 We measured cellular proliferation through MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-  
197 thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich – M2128; St.  
198 Louis, MO, USA) assay. After all the treatments and periods of incubation, RAW

199 264.7 cells were washed and resuspended in phosphate buffer (PBS 0.01M; pH  
200 7.4) to completely remove the treatments and avoid (poly)phenols interference.  
201 Samples were exposed during 1 hour to MTT reagent and then fomazan  
202 crystals were solubilized in dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich –  
203 472301; St. Louis, MO, USA). Absorbance was determined by 560nm as  
204 previously described by Fukui et al [23].

205

### 206 **Total levels of ROS measurement**

207

208       Oxidative metabolism is highly associated with inflammatory processes.  
209 In this sense, the concentration-effect curve of açai extract was tested through  
210 2,7 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich - D6883;  
211 St. Louis, MO, USA) probe assay following instructions described by Costa et al  
212 [24]. Emitted fluorescence was measured at 488nm of excitation and 525nm of  
213 emission wavelength.

214

### 215 **Nitric oxide measurement**

216

217       Nitric oxide (NO) is an important inflammatory mediator signal and highly  
218 produced by macrophage cells. We measured NO levels on concentration-  
219 effect açai extract treated cells through an indirect colorimetric method based  
220 on organic nitrate detection following instructions published by Choi et al [25].

221

### 222 **Cell cycle analysis by flow cytometry**

223

224 Cell cycle phases of mitotic process were analyzed through flow  
225 cytometry method (BD FACsVerse™ Flow Cytometer - BD Biosciences; San  
226 Jose, CA, USA). RAW 264.7 cells were synchronized with incomplete media  
227 (without FBS) and treated with the most effective concentration of açai extract  
228 by itself and against PHA exposition. After the time of incubation cells were  
229 stained with propidium iodide (Sigma-Aldrich – P4170; St. Louis, MO, USA)  
230 following instructions described by William-Faltaos et al [26].

231

### 232 **Caspases, cytokines, and NLRP3 inflammasome protein determination**

233

234 The apoptosis cascade (Quantikine Caspase Immunoassay® R&D  
235 Systems - KM300; Minneapolis, MN, USA), inflammatory (pro-inflammatory and  
236 anti-inflammatory) cytokines (Quantikine Cytokines Immunoassay® R&D  
237 Systems - D2050; Minneapolis, MN, USA), and the NLRP3-inflammasome  
238 (Cusabio-Cusab – CSBE15885h; College Park, MD, USA) were analyzed in  
239 activated RAW 264.7 cells exposed to the most effective concentration of  
240 freeze-dried hydroalcoholic açai extract through different enzyme-linked  
241 immunosorbent assays (ELISA) following the manufacture instructions.  
242 Apoptosis proteins measurement included caspase 1 (casp1). Pro-inflammatory  
243 cytokines comprised IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and INF- $\gamma$ . Anti-inflammatory cytokine  
244 included IL-10. Also, NLRP3-inflammasome was determined as a possible  
245 redox sensor link between oxidative imbalance and inflammatory activation.

246

### 247 **Statistical analysis**

248

249 All the obtained results were converted to percentage of negative control  
250  $\pm$  standard deviation. Results were statistically analyzed by two-way ANOVA  
251 followed by Tukey post hoc using Graphpad prism software, version 5.0  
252 (Graphpad Prism software, 2015; San Diego, CA, USA). Data with  $p < 0.05$  was  
253 considered significant.

254

## 255 **Results**

256

257 The effect of açai extract at different concentrations on proliferation of  
258 macrophage PHA-induced was initially evaluated. As expected, PHA exposition  
259 cells presented increased cellular activation and proliferation about 54%  
260 compared to negative control. However, when cells were concomitantly treated  
261 with açai extract and PHA, cellular proliferative rate was similar to negative  
262 control group at all açai extract concentrations investigated (figure 1A). This  
263 result was also similarly found through double-strand (ds) DNA quantification  
264 using Quant-IT™ PicoGreen® kit (Thermo Fisher – P7589; Sao Paulo, SP,  
265 Brazil) staining at treatment's supernatant as a cellular mortality and  
266 proliferation marker (data non-shown).

267 Levels of oxidative molecules were also evaluated in this protocol. Cells  
268 PHA-exposed presented higher NO production (figure 1B) and total ROS levels  
269 (figure 1C) compared to negative control cells. When cells were concomitantly  
270 exposed to PHA and different concentrations of açai extract, NO levels  
271 remained similar to untreated cells, however, higher açai concentrations  
272 increased NO production, despite these levels were lower than cells treated  
273 only with PHA. Additionally, this same profile was observed for total ROS levels

274 quantification, with significant reduction of ROS production under açai extract  
275 treatments.

276

277 FIGURE 1 HERE

278

279 From different açai concentrations tested here was possible to calculate  
280 the effective concentration to inhibit 50% macrophage cellular proliferation. The  
281 estimated concentration was 1 µg/mL of açai extract. As the results did not  
282 present an açai dose-response on macrophage mitosis, the complementary  
283 protocols were performed using just açai extract at this specific concentration.

284 Potential effect of açai extract on macrophage cell cycle was determined  
285 as showed at figure 2. As expected, cells exposed to PHA increased the  
286 frequency of S and G2 phases when compared to untreated control group. Cells  
287 PHA-exposed reduced the frequency of G1 phase in  $6.0 \pm 0.8\%$  in relation to  
288 untreated cells ( $p < 0.02$ ). Açai supplementation did not change G1 phase  
289 frequency than RAW 264.7 control cells ( $1.8 \pm 0.3\%$ ). Cells treated with PHA  
290 plus açai presented a slight increase in the frequency of G1 phase ( $102.1 \pm$   
291  $1.2\%$ ), but this difference was not significant when compared to control group.

292 Additionally, PHA increased the frequency of S+G2 phase ( $124.3 \pm$   
293  $3.2\%$ ) when compared to untreated control group ( $p < 0.001$ ). Cells exposed just  
294 to açai extract also showed significant increase in the S+G2 phases than  
295 negative control group ( $113.4 \pm 2.2\%$ ). However, this increment was not similar  
296 to RAW 264.7 cells PHA-induced. On the other hand, PHA plus açai treatment  
297 presented a reduction of S+G2 phase frequency ( $97.1 \pm 0.8\%$ ) in comparison  
298 to control group ( $p < 0.05$ ).

299

## FIGURE 2 HERE

300

301 Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were determined in  
302 treated macrophages to strongly prove açai extract anti-inflammatory capacity.  
303 Macrophages only exposed to PHA presented increased levels of all pro-  
304 inflammatory cytokines, including IL-1 beta (figure 3A), IL-6 (figure 3B), TNF-  
305 alpha (figure 3C), and IFN-gamma (figure 3D), and decrease production of anti-  
306 inflammatory cytokine IL-10 (figure 3E). On the other hand, açai extract  
307 maintained cytokines levels similarly to negative control. Under PHA-induction,  
308 açai extract treatment was able to decrease all pro-inflammatory cytokines and  
309 increased IL-10 levels.

310

311

## FIGURE 3 HERE

312

313 Finally, caspase 1 and NLRP3 inflammasome were also measured at  
314 treated and untreated cells (figure 4). Raw 264.7 cells treated with PHA  
315 presented a strong increment of caspase 1 (figure 4A) protein levels, while açai  
316 freeze-dried hydroalcoholic extract significantly decreased these levels  
317 recovering cellular apoptotic homeostasis. Additionally, NLRP3 inflammasome  
318 (figure 4B) levels were increased under macrophages PHA exposition,  
319 however, surprisingly açai hydroalcoholic extract was capable to significantly  
320 decrease NLRP3 inflammasome protein levels compared to PHA positive  
321 control.

322

323



324

FIGURE 4 HERE

325

**326 Discussion**

327

328       This cellular *in vitro* study reported the significant anti-inflammatory  
329 capacity of açai and its possible mechanism of action in murine RAW 264.7  
330 cells exposed to PHA, which is able to activate inflammatory response. Our  
331 finds suggest that açai extract promotes anti-inflammatory response through  
332 antioxidant pathway and NLRP3 inflammasome modulation (figure 5).

333

334

FIGURE 5 HERE

335

336       Since there are many different diseases that are associated with chronic  
337 immune activation, as obesity [4], diabetes [3], hypercholesterolemia, heart  
338 problems [5], and neuropsychiatric illness, as schizophrenia and BD [6,27], and  
339 also considering the current available anti-inflammatory drugs side effects, it is  
340 very interesting to develop studies searching for new inflammatory targets and  
341 new therapy alternatives. Several studies are being performed using natural  
342 products due to their biological properties. Açai fruit is a functional food with  
343 numerous bioactive effects, such as antioxidant [28–30], antitumor [31],  
344 antinociceptive [32], anti-obesity [33], neuroprotective [20,34], and anti-  
345 inflammatory [30,34,35].

346

347       Cellular proliferation evaluated in RAW 264.7 macrophages previously  
348 exposed to PHA and treated with freeze-dried hydroalcoholic açai extract  
demonstrated the anti-inflammatory potential of açai extract. Through MTT

349 assay was showed açai extract effect on inflamed macrophages, reducing cell  
350 proliferation index compared to negative control and PHA-positive control.  
351 These finds corroborate with Kang et al [29] that proved in vitro anti-  
352 inflammatory effect of açai in LPS-induced cells. Additionally, Poulouse et al [34]  
353 showed that açai-enriched diet can modulate inflammation at neuronal cells in  
354 rats, while Carey et al [36] demonstrated inflammatory attenuation in BV-2  
355 microglial cells of rats with açai pulp supplementation. Also, Schauss et al [37],  
356 Honzel et al [38], and Heinrich et al [39] have already reported açai anti-  
357 inflammatory cells. However, this açai effect pathway was not completely  
358 elucidated yet.

359       Oxidative stress also has been associated with several diseases,  
360 including metabolic diseases and neuropsychiatric illness, and most of them  
361 develop chronic immune activation [6,7,40]. In this sense, total levels of ROS  
362 were measured in açai extract treated macrophages PHA-induced. As  
363 expected, açai extract was capable to significantly reduce ROS production  
364 compared to PHA positive control, until similar levels than negative control for  
365 all concentrations. Previous study developed by our research group showed  
366 antioxidant açai extract effect on SH-SY5Y cells with mitochondrial impairment  
367 induced by rotenone exposure [20] where açai hydroalcoholic extract recovered  
368 mitochondrial function, normalizing cell oxidative metabolism that also justify our  
369 finds. Poulouse et al [34] also described açai antioxidant activity via nuclear  
370 factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) modulation, which is an antioxidant  
371 expression regulator. Moreover, NO quantification showed a similar profile  
372 observed for ROS measurement. While PHA-induced macrophages presented  
373 increased NO levels, açai extract was able to significantly decrease NO

374 production at all concentrations. NO is a physiological soluble gas which also  
375 acts at pathological situations [41,42]. NO overproduction happens under  
376 inflammatory induction or in response to pro-inflammatory cytokines, as IL-1 $\beta$ ,  
377 TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  [43]. Matheus et al [44] in an in vitro study with RAW 264.7  
378 macrophages stimulated with LPS and IFN- $\gamma$ , showed that açai berry could  
379 reduce NO production of inflamed cells. Based on all açai extract concentration-  
380 response assays the concentration able to reduce 50% of cellular proliferation  
381 was determined. Açai hydroalcoholic extract EC50 was 1  $\mu$ g/mL, and all another  
382 experimental assays were performed using this specific concentration.

383 Cell cycle modulation was determined in treated and untreated  
384 macrophages. Our results revealed that PHA exposition significantly increase  
385 S+G2 phases compared to untreated RAW 264.7 macrophages. On the other  
386 hand, concomitant PHA and açai extract treatment decreased S+G2 phases  
387 compared to PHA-positive control, causing cellular cycle arresting at these  
388 phases. This finding corroborates with a previous study performed by Ramana  
389 et al [45], which reported that induced inflammation with LPS increase cell cycle  
390 S and G2 phases and aldose reductase (AR), a ubiquitously protein, presented  
391 anti-inflammatory action by arresting G2/M phase in murine RAW 264.7  
392 macrophages LPS-induced.

393 It is already known that pro-inflammatory agents can increase pro-  
394 inflammatory and reduce anti-inflammatory cytokines production [46,47]. We  
395 have measured macrophages cytokines through enzyme-linked immunosorbent  
396 and the obtained results showed increased levels of all pro-inflammatory  
397 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ) tested and decrease levels of IL-10,  
398 under PHA inflammatory induction. On the other hand, 1  $\mu$ g/mL of açai extract

399 treatment alone did not change cytokines production compared to negative  
400 control. Additionally, açai treatment under PHA concomitant exposition was  
401 able to significantly decrease all pro-inflammatory cytokines and increase the  
402 anti-inflammatory cytokine IL-10 compared to PHA positive control. It was  
403 already reported in an *in vivo* study that açai supplemented rats presented  
404 reduced levels of NO and TNF- $\alpha$  production, protecting them against  
405 inflammatory signaling [36]. Our results are also in agreement with de Souza et  
406 al [48] that described an anti-inflammatory açai protection effect under CCI4  
407 exposition in different brain areas of rats through IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$   
408 modulation.

409         Since there are no studies showing the potential effect of açai on  
410 NLRP3-inflammasome response, we have analyzed this field. NLRP3-  
411 inflammasome is an inflammatory system recognition enzyme-complex and it is  
412 one of the most studied inflammasome worldwide [9,10,49,50]. This  
413 inflammasome is involved on inflammatory activation response via caspase 1  
414 activation, followed by IL-1 $\beta$  release and the subsequent pro-inflammatory  
415 cytokines cascade [10]. NLRP3 overexpression can activate hyperinflammation  
416 conducting to several tissue and cellular damages [49,50]. Moreover, some  
417 studies reported a close association between oxidative metabolism and NLRP3-  
418 inflammasome [10,17,51]. Some diseases, as BD, for example, present  
419 mitochondrial dysfunction, specifically at electron transport chain complex I,  
420 which consequently increase mitochondrial ROS production, conducting cells to  
421 oxidative stress [6,20,40]. This cellular imbalance is able to cause different cell  
422 damages. Also, currently has been reported that mitochondrial impairment is  
423 associated with NLRP3 activation [10]. Our results showed that PHA-induced

424 RAW 264.7 cells present high levels of NLRP3-inflammasome, while açai  
425 extract was not able to change this inflammasome production compared to  
426 negative control. Macrophages treated with 1 µg/mL of açai extract under PHA  
427 stimulation showed reduced levels of NLRP3 compared to PHA positive control.  
428 Although this effect did not reach negative control cells NLRP3 levels perhaps  
429 under repeated treatment it could be observed. Açai hydroalcoholic extract was  
430 also capable to normalize caspases 1 protein expression since PHA exposition  
431 increased its levels, what is justified by NLRP3-inflammasome reduction [9].

432 All the results obtained in this study are from *in vitro* experiments. In this  
433 sense, complementary studies using, for example, *in vivo* methods must be  
434 performed to confirm the evidences here reported, due to *in vitro*  
435 methodological limits.

436

## 437 **Concluding Remarks**

438

439 Several studies have been describing the relationship between different  
440 diseases, cellular oxidative metabolism and chronic immune activation, perhaps  
441 linked by NLRP3-inflammasome redox sensor. In this sense, efforts have been  
442 made to discover new inflammatory targets as well as new anti-inflammatory  
443 alternative therapies. Açai seems to be a fruit with antioxidant and anti-  
444 inflammatory properties effective in cells exposed to DAMP agents as PHA, for  
445 example. Açai extract acts at all inflammatory cascade pathways, since ROS  
446 levels modulation, NLRP3-inflammasome inhibition, and pro-inflammatory  
447 cytokines response via caspase 1 and IL-1β. Due to its antioxidant-anti-  
448 inflammatory capacities, açai long-term supplementation for patients with

449 neuropsychiatric illness under mitochondrial complex I dysfunction could  
450 present clinical relevance.

451

## 452 **Acknowledgments**

453

454 We would like to thank for Brazilian financial support provided by  
455 “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” and  
456 “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

457

## 458 **Funding and Disclosure**

459

460 The authors declare no conflict of interest regarding to this paper.

461

## 462 **References**

463

464 1. Cruvinel WM, Mesquita Jr. D, Araujo J, Salmazi K, Kallas E,  
465 Andrade L. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. Rev  
466 Bras Reum. 2008;48:342–55.

467 2. Rabolli V, Lison D, Huaux F. The complex cascade of cellular  
468 events governing inflammasome activation and IL-1 $\beta$  processing in  
469 response to inhaled particles. Part. Fibre Toxicol. [Internet]. Particle  
470 and Fibre Toxicology; 2015;13:40. Available from:

471 <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/>

472 s12989-016-0150-8

473 3. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Krakoff J, Knowler WC,  
474 Funahashi T, et al. Weight Gain in Humans. October. 2002;1–4.

475 4. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue  
476 inflammation in the development of obesity-induced insulin  
477 resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* [Internet].  
478 Elsevier B.V.; 2014;1842:446–62. Available from:  
479 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.017>

480 5. Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: A  
481 novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and  
482 vascular disease? *Diabetologia.* 2013;56:10–21.

483 6. Ana C. Andreatza, PharmD, PhD; Li Shao, PhD; Jun-Feng Wang,  
484 PhD; L. Trevor Young, MD P, Context: Mitochondrial Complex I  
485 Activity and Oxidative Damage to Mitochondrial Proteins in the  
486 Prefrontal Cortex of Patients With Bipolar Disorder. 2010;67:360–9.

487 7. Berk M, Kapczinski F, Andreatza AC, Dean OM, Giorlando F,  
488 Maes M, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar  
489 disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic  
490 factors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* [Internet]. Elsevier Ltd;  
491 2011;35:804–17. Available from:  
492 <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.001>

493 8. Sidiropoulos PI, Goulielmos G, Voloudakis GK, Petraki E,

- 494 Boumpas DT. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving  
495 concepts. *Ann. Rheum. Dis.* [Internet]. 2008;67:1382–9. Available  
496 from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17921182>
- 497 9. Zhou R, Yazdi A, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in  
498 NLRP3 inflammasome activation. *Nature* [Internet]. 2011;469:221–5.  
499 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09663>
- 500 10. Kim HK, Andreazza AC, Elmi N, Chen W, Young LT. Nod-like  
501 receptor pyrin containing 3 (NLRP3) in the post-mortem frontal  
502 cortex from patients with bipolar disorder: A potential mediator  
503 between mitochondria and immune-activation. *J. Psychiatr. Res.*  
504 [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;72:43–50. Available from:  
505 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.10.015>
- 506 11. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The  
507 convergence of multiple signalling pathways on ROS production?  
508 *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;10:210–  
509 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20168318>
- 510 12. Dong Z, Shang H, Chen YQ, Pan L, Bhatia M, Sun J. by  
511 Modulating Nrf2-Mediated Oxidative Stress and NLRP3  
512 Inflammatory Pathway. 2016;2016.
- 513 13. Tseng HHL, Vong CT, Kwan YW, Lee SM-Y, Hoi MPM. TRPM2  
514 regulates TXNIP-mediated NLRP3 inflammasome activation via  
515 interaction with p47 phox under high glucose in human monocytic



516 cells. *Sci. Rep.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6:35016.

517 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27731349>

518 14. Lavieri R, Piccioli P, Carta S, Delfino L, Castellani P, Rubartelli

519 A. TLR costimulation causes oxidative stress with unbalance of  
520 proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production. *J*

521 *Immunol* [Internet]. 2014;192:5373–81. Available from:

522 <http://www.jimmunol.org/content/192/11/5373.full.pdf>

523 15. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages:

524 Mechanism and functions. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.;

525 2010;32:593–604. Available from:

526 <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>

527 16. Dhande I, Ma W, Hussain T. Angiotensin AT2 receptor

528 stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-

529 1 macrophages via increased interleukin-10 production. *Hypertens.*

530 *Res.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;38:21–9. Available

531 from:

532 <http://www.nature.com/doi/10.1038/hr.2014.132>

533 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209104>

534 17. Sorbara MT, Girardin SE. Mitochondrial ROS fuel the

535 inflammasome. *Cell Res* [Internet]. Nature Publishing Group;

536 2011;21:558–60. Available from:

537 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21283134>

- 538 18. Azab A, Nassar A, Azab A. Anti-Inflammatory Activity of Natural  
539 Products. *Molecules* [Internet]. 2016;21:1321. Available from:  
540 <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/10/1321>
- 541 19. Yamaguchi KKDL, Pereira LFR, Lamarão CV, Lima ES, Da  
542 Veiga-Junior VF. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A  
543 review [Internet]. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2015. Available from:  
544 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055>
- 545 20. Machado AK, Andrezza AC, Morgana T, Boligon AA,  
546 Nascimento V, Scola G, et al. Neuroprotective Effects of Açai ( *Euterpe oleracea* Mart .) against Rotenone In Vitro Exposure.  
547 2016;2016.
- 549 21. Ford CT, Richardson S, McArdle F, Lotito SB, Crozier A,  
550 McArdle A, et al. Identification of (poly)phenol treatments that  
551 modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human  
552 lymphocytes. *Br. J. Nutr.* [Internet]. 2016;115:1699–1710. Available  
553 from:  
554 [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0007114516000805](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114516000805)
- 555 22. Hamelryck TW, Minh-Hoa DT, Poortmans F, Chrispeels MJ,  
556 Wyns L, Loris R. The Crystallographic Structure of  
557 Phytohaemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* 1996;271:20479–85.
- 558 23. Masayuki Fukui, M., Noriko Yamabe and BTZ. NIH Public  
559 Access. 2011;46:1882–91.

- 560 24. Costa F, Dornelles E, M??nica-Cattani MF, Algarve TD, De  
561 Souza Filho OC, Sagrillo MR, et al. Influence of Val16Ala SOD2  
562 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative  
563 metabolism. *Reprod. Biomed. Online.* 2012;24:474–81.
- 564 25. Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim G Do. The regulatory effect of  
565 veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7  
566 macrophage cells. *Cell. Immunol.* [Internet]. 2012;280:164–70.  
567 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>
- 568 26. William-faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G. Cell Cycle  
569 Arrest and Apoptosis Induced by Oxaliplatin ( L-OHP ) on Four  
570 Human Cancer Cell Lines. 2006;2100:2093–9.
- 571 27. Andrezza AC. B, Wang J-F., Salmasi F., Shao L., Young LT. B.  
572 Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex  
573 from patients with bipolar disorder. *J. Neurochem.* [Internet].  
574 2013;127:552–61. Available from:  
575 [http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-  
576 84887029966&partnerID=40&md5=af83b48055b830cc04e6ef98a49  
577 81550](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84887029966&partnerID=40&md5=af83b48055b830cc04e6ef98a4981550)
- 578 28. Cesar LT, de Freitas Cabral M, Maia GA, de Figueiredo RW, de  
579 Miranda MRA, de Sousa PHM, et al. Effects of clarification on  
580 physicochemical characteristics, antioxidant capacity and quality  
581 attributes of a??a?? (Euterpe oleracea Mart.) juice. *J. Food Sci.*

582 Technol. 2012;51:3293–300.

583 29. Kang J, Thakali KM, Xie C, Kondo M, Tong Y, Ou B, et al.  
584 Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior  
585 antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea*  
586 Mart. Food Chem. [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;133:671–7.  
587 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.048>

588 30. Jensen GS, Wu X, Patterson KM, Barnes J, Carter SG,  
589 Scherwitz L, et al. In vitro and in vivo antioxidant and anti-  
590 inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice  
591 blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-  
592 controlled, crossover study. J. Agric. Food Chem. 2008;56:8326–33.

593 31. Silva DF, Vidal FCB, Santos D, Costa MCP, Morgado-Díaz JA,  
594 do Desterro Soares Brandão Nascimento M, et al. Cytotoxic effects  
595 of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. BMC Complement.  
596 Altern. Med. [Internet]. 2014;14:175. Available from:  
597 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4047259>  
598 &tool=pmcentrez&rendertype=abstract

599 32. Sudo RT, Neto ML, Monteiro CES, Amaral R V, Resende ÂC,  
600 Souza PJC, et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract  
601 from *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) in a rodent model of acute and  
602 neuropathic pain. BMC Complement. Altern. Med. [Internet]. BMC  
603 Complementary and Alternative Medicine; 2015;15:208. Available

604 from: [http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84934766563&partnerID=tZOtx3y1)  
605 [84934766563&partnerID=tZOtx3y1](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84934766563&partnerID=tZOtx3y1)

606 33. De Oliveira PRB, Da Costa CA, De Bem GF, Cordeiro VSC,  
607 Santos IB, De Carvalho LCRM, et al. Euterpe oleracea Mart.-derived  
608 polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by  
609 regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. PLoS One.  
610 2015;10:1–16.

611 34. Poulouse SM, Bielinski DF, Carey A, Schauss AG, Shukitt-Hale  
612 B. Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and  
613 expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with  
614 açai-enriched diets. Nutr. Neurosci. [Internet].  
615 2016;8305:160111002821009. Available from:  
616 <http://www.maneyonline.com/doi/10.1080/1028415X.2015.1125654>

617 35. Xie C, Kang J, Li Z, Schauss AG, Badger TM, Nagarajan S, et  
618 al. The flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent:  
619 Blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through  
620 inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. J. Nutr. Biochem.  
621 [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;23:1184–91. Available from:  
622 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.013>

623 36. Carey AN, Miller MG, Fisher DR, Bielinski DF, Gilman CK,  
624 Poulouse SM, et al. Dietary supplementation with the polyphenol-rich  
625 açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.)

626 improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory  
627 signaling in BV-2 microglial cells. *Nutr. Neurosci.* [Internet]. Taylor &  
628 Francis; 2015;0:1–8. Available from:  
629 [https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-  
630 84978499613&partnerID=40&md5=eb220888a307ecec9b759e9081  
631 5a0b09](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84978499613&partnerID=40&md5=eb220888a307ecec9b759e90815a0b09)

632 37. Ag S, Wu X, RI P, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant  
633 capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm  
634 berry , *Euterpe oleraceae* mart . ( Acai ). *J. Agric. Food Chem.*  
635 [Internet]. 2008;54:8604–10. Available from:  
636 [file:///C:/Users/franklinherbert/Documents/Antioxidant Capacity and  
637 Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry.pdf](file:///C:/Users/franklinherbert/Documents/Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry.pdf)

638 38. DANA HONZEL,† STEVE G. CARTER,† KIMBERLEE A.  
639 REDMAN,† ALEXANDER G. SCHAUSS,‡ JOHN R. ENDRES  
640 AGSJ. Comparison of Chemical and Cell-Based Antioxidant  
641 Methods for Evaluation of Foods and Natural Products : Generating  
642 Multifaceted Data by Parallel Testing Using Erythrocytes and  
643 Polymorphonuclear. 2008;8319–25.

644 39. Heinrich M, Dhanji T, Casselman I. Aai (*Euterpe oleracea* Mart.)  
645 - A phytochemical and pharmacological assessment of the species'  
646 health claims. *Phytochem. Lett.* [Internet]. Phytochemical Society of  
647 Europe; 2011;4:10–21. Available from:

648 <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2010.11.005>

649 40. Scola G, Kim HK, Young LT, Andrezza AC. A fresh look at  
650 complex i in microarray data: Clues to understanding disease-  
651 specific mitochondrial alterations in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry*  
652 [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;73:e4–5. Available from:  
653 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.06.028>

654 41. Zhao Y, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JPM, Babcock GT,  
655 Marletta MA. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ.  
656 *Biochemistry*. 2000;39:10848–54.

657 42. Monteiro HP, Silva EF, Stern A. Nitric oxide: A potential inducer  
658 of adhesion-related apoptosis - Anoikis. *Nitric Oxide - Biol. Chem.*  
659 2004;10:1–10.

660 43. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N.*  
661 *Engl. J. Med.* [Internet]. Massachusetts Medical Society;  
662 1993;329:2002–12. Available from:  
663 <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199312303292706>

664 44. Matheus ME, Fernandes SB de O, Silveira CS, Rodrigues VP,  
665 Menezes F de S, Fernandes PD. Inhibitory effects of Euterpe  
666 oleracea Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J.*  
667 *Ethnopharmacol.* 2006;107:291–6.

668 45. Kota V Ramana\*, Aramati BM. Reddy, Ravinder Tammali and  
669 SKS. NIH Public Access. Computer (Long. Beach. Calif).

670 2008;144:724–32.

671 46. Zhao D, Kwon S-H, Chun YS, Gu M-Y, Yang HO. Anti-  
672 Neuroinflammatory Effects of Fucoxanthin via Inhibition of Akt/NF-  
673  $\kappa$ B and MAPKs/AP-1 Pathways and Activation of PKA/CREB  
674 Pathway in Lipopolysaccharide-Activated BV-2 Microglial Cells.  
675 *Neurochem. Res.* [Internet]. Springer US; 2016;0:0. Available from:  
676 <http://link.springer.com/10.1007/s11064-016-2123-6>

677 47. Liu X, Li G. MicroRNA-133b inhibits proliferation and invasion of  
678 ovarian cancer cells through Akt and Erk1 / 2 inactivation by  
679 targeting epidermal growth factor receptor. 2015;8:10605–14.

680 48. de Souza Machado F, Marinho JP, Abujamra AL, Dani C,  
681 Quincozes-Santos A, Funchal C. Carbon Tetrachloride Increases  
682 the Pro-inflammatory Cytokines Levels in Different Brain Areas of  
683 Wistar Rats: The Protective Effect of Acai Frozen Pulp. *Neurochem.*  
684 *Res.* 2015;40:1976–83.

685 49. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and Their Roles in Health  
686 and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012;28:137–61.

687 50. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in  
688 health and disease. *Nature.* 2012;481:278–86.

689 51. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S,  
690 et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3  
691 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.;



692 2012;36:401–14.

Available

from:

693 <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>

694

695

## 696 **Figure legends**

697

698 **Figure 1:** Cellular proliferation and oxidative metabolism. A) Cell proliferation of  
699 RAW 264.7 PHA-activated and exposed to freeze-dried hydroalcoholic açai  
700 extract during 72h measured by MTT assay; B) Total levels of ROS  
701 measurement through DCFH-DA fluorimetric assay of macrophages PHA-  
702 induced and exposed to different concentrations of freeze-dried hydroalcoholic  
703 açai extract during 72h; C) NO levels quantification of RAW 264.7 cells PHA-  
704 activated and exposed to açai extract during 72h. Showing the anti-proliferative  
705 and antioxidant activities of açai extract. Statistical differences are shown by  
706 different letters.

707

708 **Figure 2:** Macrophage cell cycle modulation under PHA exposition followed by  
709 1 µg/mL açai extract treatment showing G2/M phases cell cycle arresting effect  
710 of açai extract under PHA inflammatory activation. A) Untreated cells; B) PHA-  
711 induced macrophages; C) 1 µg/mL açai extract exposition; D) Concomitant PHA  
712 and açai extract treatment.

713

714 **Figure 3:** Inflammatory system cytokines production of RAW 264.7  
715 macrophages PHA-induced. A) IL-1β protein quantification; B) IL-6 protein  
716 quantification; C) TNF-α protein quantification; D) IFN-γ protein quantification;  
717 E) IL-10 protein quantification. Results show inflammatory cytokines recovering  
718 under açai extract exposition of activated macrophages. Statistical differences  
719 are shown by different letters.

720

721 **Figure 4:** Caspase 1 and NLRP3 inflammasome activation of RAW 264.7  
722 macrophages PHA-induced. A) Caspase 1 (casp1) measurement; B) NLRP3  
723 inflammasome measurement. Results demonstrate caspase 1 and NLRP3  
724 inflammasome modulated by açai freeze-dried hydroalcoholic extract in  
725 activated macrophages. Statistical differences are shown by different letters.  
726

727 **Figure 5:** M1 macrophages ROS levels can be increased by DAMP factors  
728 such as mitochondrial dysfunction inductor or PHA antigen exposure (1). PHA  
729 plus açai extract (1 µg/mL) decreased ROS levels. ROS induces  
730 overexpression and oligomerization (2) of NLRP3 inflammasome with ASC and  
731 caspase 1. PHA plus açai extract presented a stronger lowering effect on  
732 NLRP3 levels and also reduced caspase 1 activation (3). Caspase 1 normally  
733 cleaves pro-IL-1 $\beta$  to IL-1  $\beta$ , and this molecule trigger overexpression of pro-  
734 inflammatory cytokines (IL-6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ ), increasing NO levels and  
735 macrophage proliferation. Açai plus PHA reduced partially all levels of these  
736 pro-inflammatory molecules in comparison to untreated control cells (4). This  
737 treatment also decreased macrophage proliferation (5). During an inflammatory  
738 response latter M1 cells are polarized in M2 macrophages producing anti-  
739 inflammatory cytokines, such as IL-10, which has inhibitory effect on IL-1 $\beta$  and  
740 other pro-inflammatory cytokines stopping the inflammatory progression. Açai  
741 plus PHA increased partially IL-10 levels when compared to cells just PHA  
742 treated (6).

743

744

745

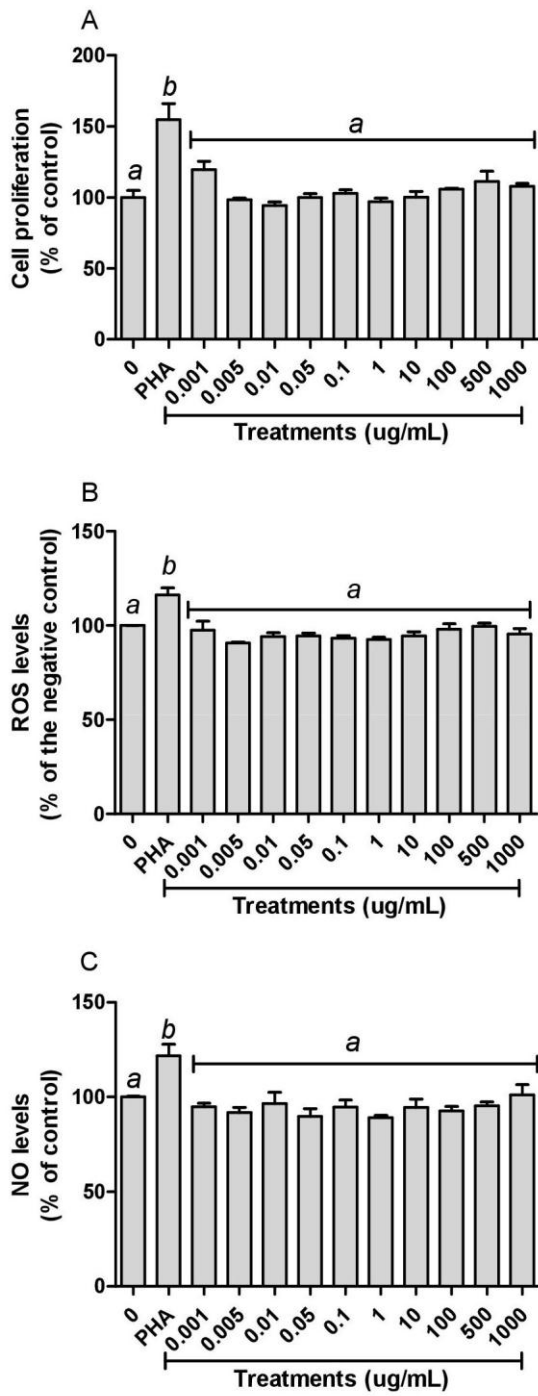
746

747

748

749

750 Figure 1



751

752

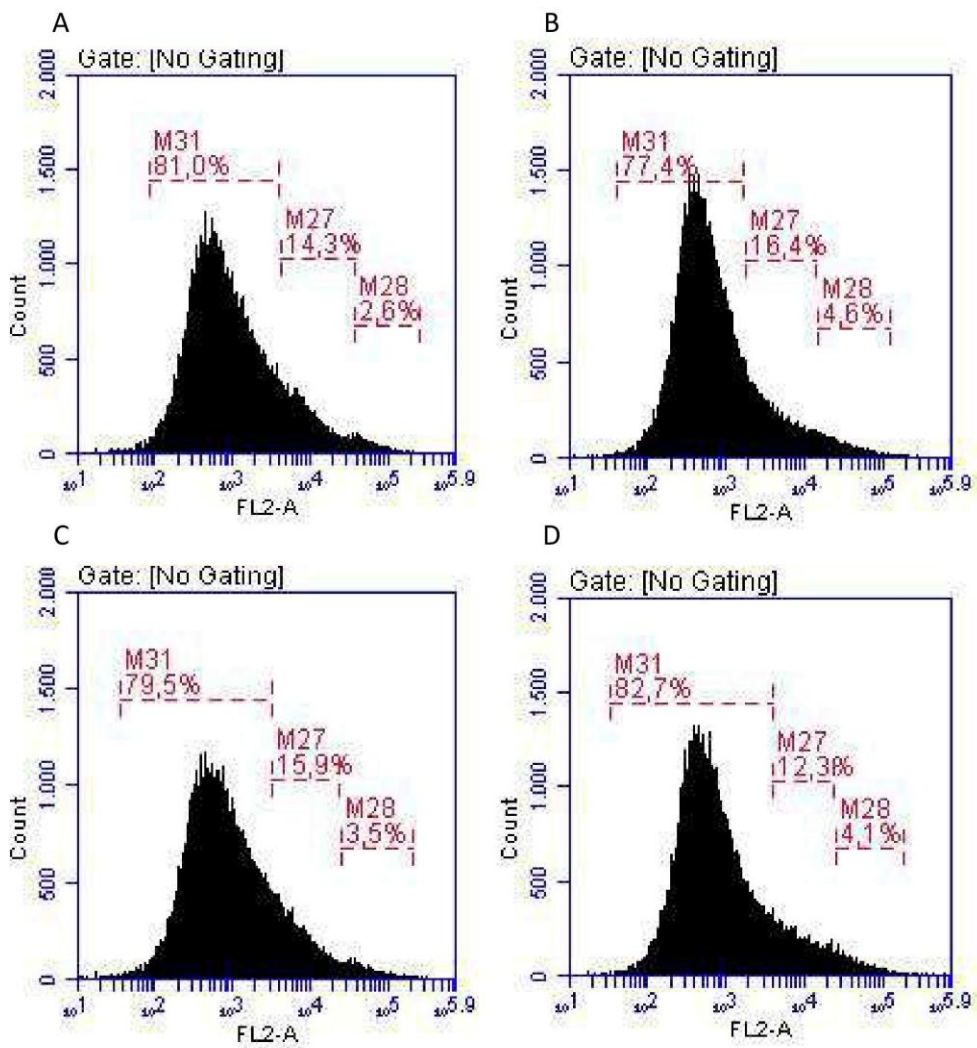
753

754

755

756

757 Figure 2



758

759

760

761

762

763

764

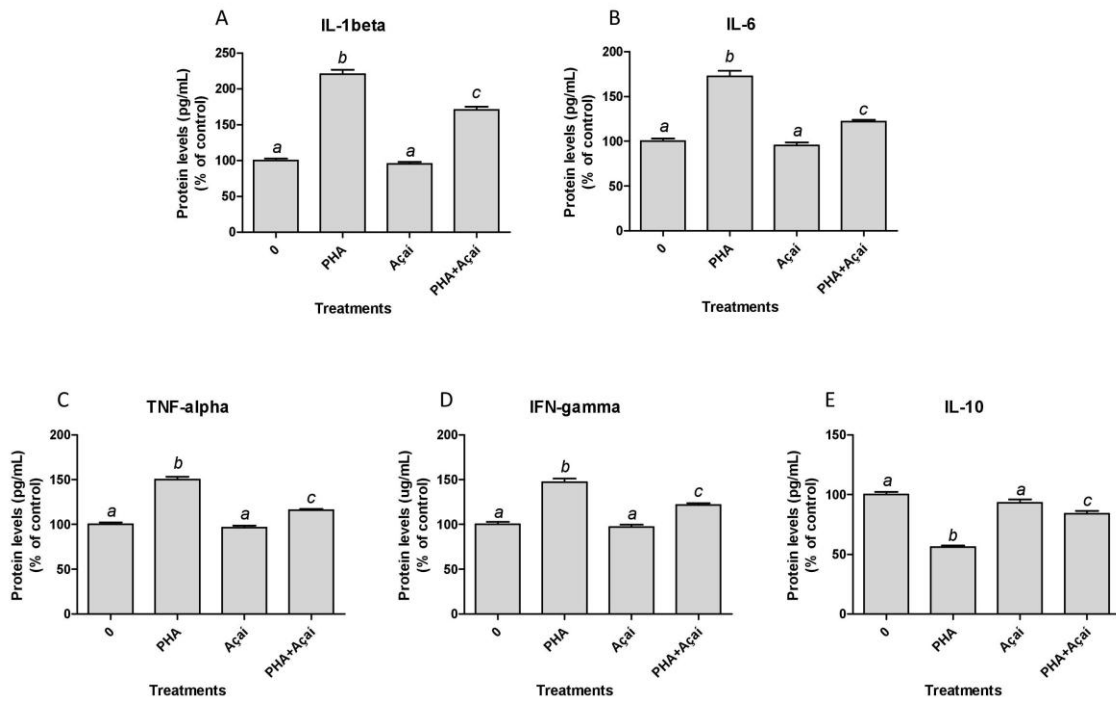
765

766

767

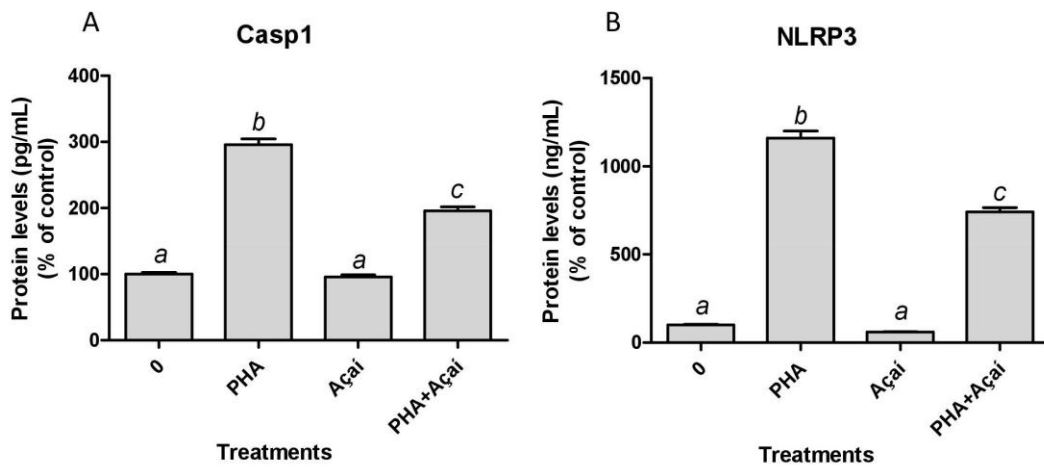
768

769 Figure 3



770

771 Figure 4



772

773

774

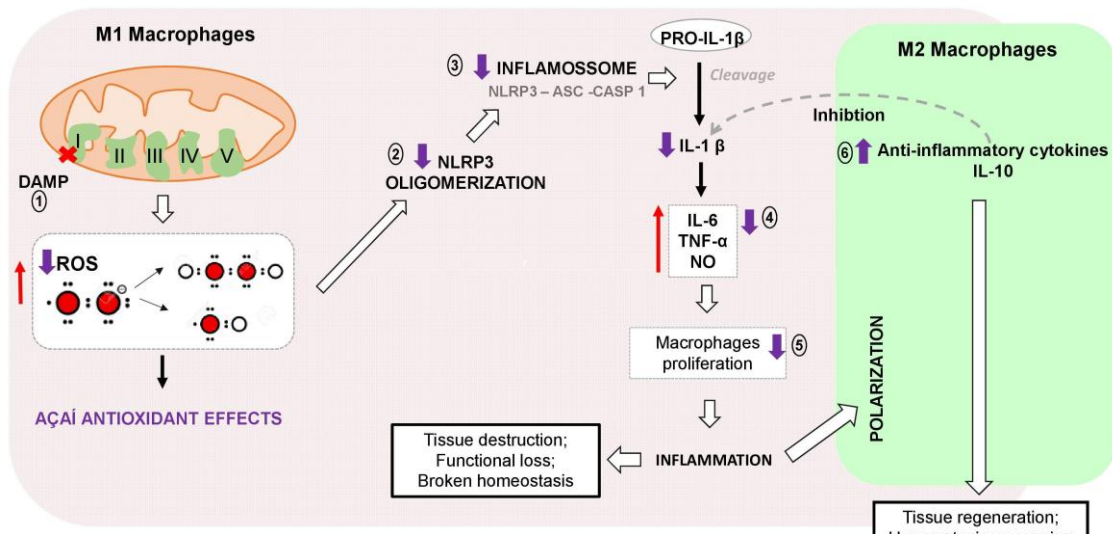
775

776

777

778

779



## 4 DISCUSSÃO

O conjunto dos resultados contribuiu para a consolidação da relevância das disfunções mitocondriais em doenças neuropsiquiátricas e também sugeriram fortemente que o açaí, fruto amazônico rico em diversas substâncias bioativas, poderia reverter disfunções mitocondriais, especialmente as que ocorrem no complexo mitocondrial I e possuir ação anti-inflamatória. A seguir estes resultados são discutidos em maior profundidade.

A partir da revisão de literatura feita, foram compilados resultados de uma série de estudos que destacam a relevância das disfunções mitocondriais como mecanismo causal de doenças neuropsiquiátricas, em especial no transtorno bipolar e na esquizofrenia. O entendimento da etiologia e fisiopatologia de doenças neuropsiquiátricas são de grande necessidade para a descoberta de novos biomarcadores específicos e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Alguns estudos vêm sugerindo que existe um relevante papel da disfunção mitocondrial e a psicose maior (CLAY et al., 2011; LIN e BEAL, 2006; MANJI et al., 2012; SCOLA et al., 2013).

Tanto o transtorno bipolar quanto a esquizofrenia são doenças heterogêneas e extremamente complexas (ANDREAZZA et al., 2007; ANDREAZZA et al., 2010). Todavia, as vias celulares, descritas no primeiro artigo que compõe esta tese, encontradas na esquizofrenia e transtorno bipolar, podem ser sumarizadas como: mutações no DNA mitocondrial e nuclear, desbalanço da homeostase intracelular do cálcio e alterações na dinâmica mitocondrial. Além disso, aparentemente a disfunção mitocondrial observada em indivíduos com transtorno bipolar é diferenciada da que ocorre em pacientes com esquizofrenia. Apesar de ambas as patologias apresentarem modulação redox e conseqüentemente, danos celulares devido ao desbalanço do metabolismo oxidativo, indivíduos com transtorno bipolar possuem maior associação com disfunção no complexo mitocondrial I com significativa redução na expressão de genes nucleares vinculados a produção de importantes subunidades que fazem parte desse complexo, principalmente dos genes *NDUFS7* e *NDUFS8*.

Ademais, os fármacos disponíveis para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas são bastante limitados em termos de eficácia e segurança, devido a pacientes tratados cronicamente que se tornam refratários a ação dos medicamentos e passam a apresentar efeitos colaterais indesejáveis (CORRELL et al., 2010; KOUKOPOULOS et al., 1995; POST e LEVERICH, 2008). O tratamento farmacológico para o transtorno bipolar, por exemplo, é baseado no uso de estabilizadores do humor (CURRAN e RAVINDRAN, 2014; GOODWIN,

2009; GRUNZE et al., 2010). Todavia, os efeitos colaterais decorrentes do tratamento de longo prazo são importantes fatores que podem conduzir o paciente a desistência do tratamento medicamentoso e, conseqüentemente, ao comprometimento da medida terapêutica e recidiva sintomatológica (GRUNZE et al., 2010; KLEINER et al., 1999; LLERENA et al., 2013; MARKOWITZ et al., 2000; RIEDEL et al., 2005; YOUNG e NEWHAM, 2006). Desse modo, a investigação de novas alternativas farmacológicas na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos se faz de grande importância e validade. Muitos são os trabalhos que vêm demonstrando os potenciais efeitos bioativos e farmacológicos de produtos naturais, principalmente provenientes da Amazônia brasileira, em virtude da grande biodiversidade local (JOBIM et al., 2014; MACHADO et al., 2015; MOSTARDEIRO et al., 2014; SAGRILLO et al., 2015; SOUZA-FILHO et al., 2013). Nesse sentido, um fruto amazônico que está ganhando destaque é o *Euterpe oleracea* Mart., conhecido popularmente como açaí (KANG et al., 2012). O açaí possui diversas moléculas bioativas que garantem a este fruto potenciais atividades antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (JENSEN et al., 2008; POULOSE et al., 2016; SUN et al., 2010). No segundo artigo, apresentado nesta tese, foi avaliado o potencial efeito do extrato hidroalcoólico de açaí na prevenção e reversão da disfunção do complexo mitocondrial I induzida pela exposição de células neuronais-like à rotenona em diferentes concentrações.

No segundo trabalho aqui descrito, um extrato hidroalcoólico de açaí foi produzido, quimicamente caracterizado e o seu efeito *in vitro* na disfunção mitocondrial de células neurais-like foi determinado. Através da determinação dos constituintes químicos presentes no extrato hidroalcoólico de açaí, utilizando nesse estudo, via CLAE, foram detectados substâncias com importantes capacidades bioativas, destacando-se principalmente a orientina, o ácido *p*-cumárico e a apigenina. A orientina é uma importante substância fenólica que possui comprovada atividade antioxidante, anti-inflamatória e também neuroprotetora (BRAZIER-HICKS et al., 2009; LAW et al., 2014; SIMIRGIOTIS et al., 2013; YOO et al., 2014). An e colaboradores (2012) demonstraram que a orientina é capaz de desempenhar atividade antioxidante em ultraestruturas neurais sob condições de estresse oxidativo. Já o ácido *p*-cumárico, também uma molécula fenólica, é conhecido principalmente pela capacidade de neutralização de radicais livres (MATHEW et al., 2015), assim como a apigenina. Além disso, a apigenina possui também considerável efeito neuroprotetor, cruzando facilmente a barreira sangue-cérebro (POPOVIC et al., 2014) e não causa efeito de toxicidade até mesmo sob altas dosagens (HOLLMAN e KATAN, 1999). Também foram identificados algumas outras moléculas como membros do extrato de açaí em teste, como a



cianidina-3-*O*-glicosídeo e a epicatequina, por exemplo, porém em menores concentrações quando comparados às substâncias citadas acima. Nesse sentido, estes resultados provam que o extrato hidroalcoólico de açaí apresenta diferentes substâncias biofuncionais, sugerindo que este fruto pode possuir potencial efeito protetor contra doenças neuropsiquiátricas, seja por via mitocondrial ou inflamatória.

A exposição das células SH-SY5Y a diferentes concentrações de rotenona (5, 15 e 30 nM), diminuiu a viabilidade celular de forma concentração-dependente, corroborando com os achados de Kim e colaboradores (2015). Por outro lado, a curva concentração-efeito do extrato de açaí, demonstrou que o extrato é capaz de aumentar a viabilidade celular através de uma resposta hormética. Este aumento na viabilidade celular foi principalmente observado após 48h de exposição ao extrato e o valor de EC50 neste tempo de incubação foi de 5 µg/mL. Logo, todos os demais experimentos realizados a fim de contemplar os objetivos propostos na pesquisa referente ao segundo manuscrito foram conduzidos considerando esta concentração específica de extrato de açaí e tempo de exposição. Esses resultados estão em concordância com Wong e colaboradores (2013), os quais sugeriram o potencial efeito neuroprotetor do extrato de açaí nas concentrações de 5 e 50 µg/mL contra a exposição ao peptídeo β-amiloide. Adicionalmente, as imagens obtidas através da análise microscópica, suportam o observado via ensaio XTT, de forma que a exposição à rotenona, apesar de não ter causado alterações cito-morfológicas, reduziu consideravelmente o número de células de forma concentração-dependente. Todavia, o tratamento com 5 µg/mL de extrato de açaí, tanto antes quanto após a exposição à rotenona, aumentou o número de células viáveis de forma similar ao observado para o controle negativo.

A exposição à rotenona também acarretou a diminuição dos níveis proteicos do complexo mitocondrial I, determinado a partir do ensaio de enzimaímoensaio OXPHOS. Todavia, o extrato de açaí mostrou-se capaz de prevenir e reverter tal condição induzida pela rotenona, porém esta resposta foi concentração-independente. Por outro lado, a exposição à rotenona desencadeou um aumento nos níveis relativos aos complexos mitocondriais II e III e o açaí atuou de forma a reduzir significativamente tais níveis tanto para a análise preventiva quanto reversiva. A rotenona é um produto químico conhecido por inibir a atividade do complexo mitocondrial I (HALLIWELL, 2001) e esta alteração faz com que a cadeia de transporte de elétrons passe a tentar compensar esta disfunção através dos complexos II e III, a fim de manter a produção energética. Corroborando com os achados obtidos para avaliação dos níveis proteicos de cada complexo mitocondrial, a análise da atividade enzimática do complexo I, comprovou a afinidade do extrato de açaí para tal complexo. Enquanto as células

SH-SY5Y apresentaram redução na atividade do complexo mitocondrial I sob exposição à rotenona, o extrato aumentou significativamente esta atividade em ambos os modelos experimentais, prevenção e reversão. Estes resultados sugerem uma potencial atividade do extrato de açaí no complexo mitocondrial I. Em um estudo desenvolvido por Scola e colaboradores (2014) com neurônios corticais E18 de ratos foi demonstrado que o lítio na concentração de 0,75 mM aumenta a atividade do complexo mitocondrial I de células previamente expostas à rotenona. Entretanto, este aumento, apesar de significativo, não chegou aos níveis normais de atividade comparados ao controle negativo. Os resultados observados para o extrato de açaí comprovam a eficácia do extrato na concentração de 5 µg/mL na normalização da atividade do complexo I de forma ainda mais eficiente do que o observado para o lítio, o qual atualmente, é o estabilizador de humor mais recomendado no tratamento do transtorno bipolar.

Para averiguar a via pela qual o extrato de açaí atua sob o complexo mitocondrial I foram analisadas as expressões proteicas e gênicas de algumas das principais subunidades formadoras deste complexo, as quais NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 e NDUFV2. Enquanto a rotenona reduziu as expressões, proteica e gênica, das subunidades testadas, o açaí aumentou estas expressões em alguns dos modelos experimentais propostos. Ademais, a principal subunidade na qual o extrato de açaí apresentou resultados significativos tanto de prevenção quanto reversão, foi a subunidade NDUFS7, tanto na avaliação por *western blot* quanto por qRT-PCR. A rotenona ocasiona a disfunção mitocondrial principalmente através da inativação da transferência dos elétrons para a ubiquinona. Dessa forma, pode-se dizer que este agente químico atua inativando o módulo Q do complexo I, como também a rotenona é capaz de comprometer importantes fatores de transcrição gênica (GUERRA et al., 2011; SCOLA et al., 2014). Em contrapartida, já se sabe que o extrato de açaí apresenta influência na expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo celular, principalmente de enzimas antioxidantes, incluindo a SOD, CAT e GPx (GUERRA et al., 2011). Entretanto, a via pela qual o açaí modula a expressão de tais genes ainda não está elucidada, porém, uma potencial teoria é de que o açaí poderia aumentar a produção de fatores de transcrição, como o NRF2 através da atuação de substâncias flavonoides (MASELLA et al., 2005). Nesta perspectiva, acredita-se que o extrato de açaí atua consideravelmente no módulo Q do complexo mitocondrial I, principalmente na subunidade NDUFS7, através do aumento na expressão do gene desta proteína.

O efeito da rotenona na produção total de EROs e lipoperoxidação, assim como a capacidade de prevenção e/ou reversão exercida pelo extrato de açaí nas células neuronais-

*like* foi também analisado. Como esperado, a rotenona aumentou os níveis totais de produção de EROs de maneira concentração-dependente, conseqüentemente, tais células apresentaram o mesmo perfil de aumento quanto a lipoperoxidação. Por outro lado, para ambos os experimentos realizados, a exposição ao extrato de açaí na concentração de 5 µg/mL mostrou-se capaz de reduzir significativamente os níveis totais de EROs assim como conter a lipoperoxidação, demonstrando o efeito citoprotetor exercido pelo extrato sob células SH-SY5Y. A associação entre doenças neuropsiquiátricas e a disfunção mitocondrial é bastante evidente, como no transtorno bipolar, com conseqüentes danos celulares em decorrência da perda da homeostase oxidativa celular (ANDREAZZA et al., 2007; ANDREAZZA et al., 2010; MOYLAN et al., 2014). Além disso, existem muitas evidências de que diversas doenças possuem associação com a ativação inflamatória crônica, incluindo problemas metabólicos, como obesidade (BYUNG-CHEOL e JONGSOON, 2014), diabetes (VOZAROVA et al., 2001), cardiopatias, hipercolesterolemia (KRALISCH e FASSHAUER, 2013) e até mesmo doenças neuropsiquiátricas, incluindo esquizofrenia e transtorno bipolar (ANDREAZZA et al., 2010; ANDREAZZA et al., 2013), o que torna de grande interesse científico a realização de pesquisas que busquem por métodos anti-inflamatórios específicos que possam minimizar ou eliminar a resposta inflamatória exacerbada. Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados também utilizando produtos naturais. Como já mencionado, dentre uma variedade de aspectos positivos, o açaí também possui atividade anti-inflamatória cientificamente comprovada (XIE et al., 2012; JENSEN et al., 2008; POULOSE et al., 2016). Contudo, os mecanismos pelos quais tal efeito ocorre ainda não estão completamente elucidados.

No terceiro manuscrito, desenvolvido como parte desta tese de doutorado, foi avaliada a capacidade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de açaí frente a macrófagos RAW 264.7 ativados com PHA, avaliando se tal efeito ocorreria via modulação do inflamassoma NLRP3. Macrófagos expostos durante 72h à PHA apresentaram um aumento significativo da proliferação celular comparado ao controle negativo. Por outro lado, todas as concentrações de extrato hidroalcoólico de açaí, testadas na curva concentração-efeito nos macrófagos ativados, induziram redução da proliferação celular quando comparado às células tratadas somente com PHA. Esses resultados estão em concordância com as descrições de Schauss e colaboradores (2006), Heinrich e colaboradores (2011) e Kang e colaboradores (2012) que relataram o potencial efeito anti-inflamatório do açaí frente a diferentes modelos experimentais de inflamação, de forma a reduzir a ativação e proliferação celular de células inflamatórias.

Considerando a forte associação entre o sistema inflamatório ativado e o estresse oxidativo em indivíduos com doenças neuropsiquiátricas, incluindo o transtorno bipolar (SCOLA et al., 2013; ANDREAZZA et al., 2010; BERK et al., 2011), foi avaliada a modulação de parâmetros do metabolismo oxidativo celular através do tratamento de macrófagos ativados com diferentes concentrações de extrato de açaí. Enquanto o tratamento com somente PHA causou aumento na produção total de EROs, a exposição ao extrato de açaí, em todas as concentrações testadas, levou a uma redução na quantidade total de EROs, a níveis similares ao controle negativo. O estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa que compõe o segundo artigo descrito nesta tese (MACHADO et al., 2016) corrobora com esses achados, já que a exposição ao extrato de açaí reduziu o estresse oxidativo ocasionado em células neuronais-like pela disfunção mitocondrial no complexo I, de forma a reduzir os níveis totais de EROs via recuperação do funcionamento mitocondrial. Poulou e colaboradores (2016) também já havia previamente descrito o potencial antioxidante do açaí através da modulação do regulador de expressão antioxidante denominado fator nuclear (derivado de eritróide)-like 2 (NRF2, do inglês *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like*). Um mediador de grande importância na sinalização e mediação da ativação inflamatória é o gás solúvel NO, o qual também atua em situações patológicas (ZHAO et al., 2000; MONTEIRO et al., 2004). Sendo assim, os níveis de NO também foram mensurados nesse estudo de forma indireta. Macrófagos expostos somente a PHA apresentaram aumento na produção de NO, enquanto que todas as concentrações testadas do extrato hidroalcoólico de açaí apresentaram capacidade de reduzir tal aumento. Já se sabe que os níveis de NO aumentam consideravelmente durante a indução inflamatória por agentes DAMP ou PAMP, bem como em resposta às citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (MONCADA et al., 1993). Os resultados aqui descritos corroboram com o estudo de Matheus e colaboradores (2006), onde macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  quando tratados com açaí apresentaram diminuição na produção de NO, comparado aos controles positivos. Possuindo por base os ensaios nos quais foi testada a curva concentração-efeito de extrato de açaí frente à ativação inflamatória com PHA, principalmente considerando a avaliação da proliferação celular, foi determinada a concentração efetiva capaz de reduzir 50% da proliferação celular (EC50, do inglês *effective concentration 50%*). O valor de EC50, determinado via cálculo de *log* da curva de concentrações realizada, obtido foi de 1  $\mu$ g/mL e todos os demais ensaios realizados nesse terceiro estudo foram conduzidos utilizando esta concentração específica de extrato de açaí.

A modulação do ciclo celular foi determinada nas células expostas aos diferentes tratamentos propostos. Os resultados revelaram que a exposição a PHA aumentou significativamente as fases de síntese e G2 (S+G2) quando comparado a células não tratadas. Por outro lado, o tratamento concomitante de PHA e 1 µg/mL de extrato de açaí reduziu as fases S+G2 comparado as células tratadas somente com PHA, causando um bloqueio na passagem das células para essas fases do ciclo mitótico. Essa modulação do ciclo celular vão de encontro aos resultados obtidos por Ramana e colaboradores (2007). Nesse estudo, os autores demonstraram que células expostas ao LPS apresentaram aumento significativo no número de células nas fases S e G2, enquanto que o tratamento com aldose redutase (AR), uma enzima oxidoreductase dependente de NADPH, apresentou atividade anti-inflamatória por impedir que macrófagos 264.7 ativados passassem para as fases S e G2 do ciclo celular.

Já se tem conhecimento de que agentes pró-inflamatórios, incluindo DAMPs e PAMPs, são capazes de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzir os níveis de citocinas anti-inflamatórias (ZHAO et al., 2016; LI et al., 2015). Logo, foi verificada a produção de citocinas inflamatórias (pró e anti-inflamatórias) de macrófagos ativados com PHA e/ ou tratados com extrato de açaí através de método de imunoabsorção enzimática (ELISA). As células fagocíticas tratadas somente com extrato de açaí não apresentaram modificação quanto à produção de todas as citocinas avaliadas, mantendo-se a níveis similares ao controle negativo. Assim como esperado, macrófagos tratados com somente PHA apresentaram aumento significativo da produção de todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas, IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ, e diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10, comparado a células não tratadas. Em contrapartida, quanto concomitantemente expostos a 1 µg/mL de extrato de açaí e PHA, os macrófagos apresentaram significativa redução na produção das citocinas pró-inflamatórias e aumento na produção de IL-10, comparado ao controle positivo de PHA. Em um modelo experimental *in vivo*, foi demonstrado que a suplementação alimentar de ratos com açaí causou a redução dos níveis de ON e da produção de TNF-α, protegendo esses animais contra a sinalização e ativação da cascata inflamatória (CAREY et al., 2015). Os resultados obtidos nesta pesquisa estão em concordância com a investigação realizada por Souza e colaboradores (2015), os quais relataram o potencial efeito anti-inflamatório do açaí em diferentes áreas cerebrais de animais expostos à CCL4, principalmente através da modulação de citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-18 e TNF-α.

Uma vez que não existem evidências científicas sobre o efeito do açaí sobre o inflamassoma NLRP3, a expressão proteica foi avaliada via ensaio de ELISA. O inflamassoma NLRP3 é um importante complexo proteico que atua como sistema de

reconhecimento inflamatório e que vem sendo bastante estudado por diferentes grupos de pesquisa (ZHOU et al., 2011; LAMKANFI e DIXIT, 2012; STROWIG et al., 2012; KIM et al., 2016). Esse inflamassoma está envolvido na ativação inflamatória via acionamento da caspase 1, que por sua vez atua na liberação de IL-1 $\beta$  ativada e, em seguida, na produção de citocinas pró-inflamatórias (KIM et al., 2016). A superexpressão e formação do complexo NLRP3 ativa uma resposta inflamatória exacerbada, que, por vez, conduz a variados danos celulares e perda da homeostase (LAMKANFI e DIXIT, 2012; STROWIG et al., 2012). Além disso, alguns estudos vêm sugerindo uma grande associação entre o metabolismo oxidativo celular e o inflamassoma NLRP3, de forma que este complexo proteico age como sensor redox (SORBARA e GIRARDIN, 2011; SHIMADA et al., 2012; KIM et al., 2016). Assim como já mencionado anteriormente, algumas doenças apresentam disfunção mitocondrial, sendo que no transtorno bipolar essa disfunção parece ser específica no complexo mitocondrial I, o que, conseqüentemente, aumenta a produção mitocondrial de EROs, causando estresse oxidativo (ANDREAZZA et al., 2010; ANDREAZZA et al., 2013; MACHADO et al., 2016). Ainda, esse desbalanço oxidativo poderia ativar a produção e formação do inflamassoma NLRP3, ativando toda a cascata inflamatória (KIM et al., 2016). Os resultados obtidos com o modelo inflamatório utilizado demonstraram que macrófagos tratados somente com PHA apresentaram aumento da produção de NLRP3, comparado ao controle negativo e à células expostas somente ao extrato de açaí. Já macrófagos concomitantemente tratados com PHA e 1  $\mu$ g/mL de extrato de açaí apresentaram redução significativa dos níveis de NLRP3 comparado ao controle positivo de PHA. Apesar de a exposição ao extrato não ter diminuído o inflamassoma ao mesmo nível encontrado para o controle negativo, acredita-se que talvez o tratamento repetido ou de maior período de tempo, possa apresentar tal efeito. Além disso, o extrato hidroalcoólico de açaí a 1  $\mu$ g/mL mostrou-se também atuar como modulador capaz de renormalizar a expressão proteica da caspase 1, o que pode ser justificado pela ação do extrato sob o inflamassoma NLRP3.

Dessa forma, considerando todos os estudos apresentados no presente trabalho, pode-se dizer que as doenças neuropsiquiátricas apresentam fisiopatologia bastante complexa e merecedora de especial atenção. A forte associação entre o transtorno bipolar e a disfunção mitocondrial no complexo I, assim como com a ativação inflamatória crônica, permite que sejam investigadas e desenvolvidas novas alternativas de tratamento para tais indivíduos. Nesse sentido, através desse estudo, foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico de açaí é capaz de recuperar o funcionamento do complexo mitocondrial I, renormalizando a cadeia de transporte de elétrons e reduzindo o estresse oxidativo via atuação gênica e proteica. Além

disso, o extrato de açaí mostrou-se potencialmente capaz de neutralizar a ativação inflamatória induzida por PHA via modulação positiva do inflamassoma NLRP3. Sendo assim, acredita-se que o extrato de açaí seja um forte candidato a efetivação de pesquisas científicas mais aprofundadas e que visem o desenvolvimento farmacológico direcionado ao transtorno bipolar, principalmente considerando a matriz química que compõe tal fruto, pois inclui uma grande variedade de substâncias com capacidades bioativas.

Todos os resultados obtidos nessa pesquisa foram atingidos a partir de ensaios *in vitro*. Logo, devido a limitações metodológicas, estudos complementares utilizando outros modelos experimentais, como *in vivo*, por exemplo, se fazem de grande validade para a confirmação das evidências encontradas.





## 5 CONCLUSÃO (CONSIDERAÇÕES GERAIS)

Revisão de literatura sugere importante associação entre transtorno bipolar e disfunção mitocondrial.

Os resultados *in vitro* obtidos e descritos no segundo artigo mostraram que:

- o extrato hidroalcoólico do açaí possui diversas moléculas bioativas sendo que a orientina, o ácido *p*-cumárico e a apegénina apresentam-se em maiores concentrações;
- o açaí per se foi capaz de aumentar a viabilidade celular na concentração de 5 µg/mL;
- o açaí aumentou a viabilidade das células expostas a diferentes concentrações de rotenona, que causa disfunção mitocondrial no complexo I;
- o açaí foi capaz de reverter ou prevenir a disfunção do complexo mitocondrial I;
- o açaí foi capaz de reverter ou prevenir o estresse oxidativo decorrente da exposição à rotenona;
- o efeito do açaí no complexo mitocondrial envolveu a modulação da expressão de proteínas e genes formadores com módulo Q do complexo mitocondrial I.

Os resultados *in vitro* obtidos e descritos no terceiro manuscrito demonstraram que:

- o extrato hidroalcoólico de açaí é capaz de reduzir a proliferação celular de macrófagos ativados com PHA;
- o extrato de açaí reduz o estresse oxidativo, diminuindo a produção de EROs e de ON;
- o extrato de açaí modula o ciclo celular, impedindo que as células fagocíticas inflamadas passem para as fases S e G2;
- 1 µg/mL de extrato de açaí é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a IL-10 de macrófagos ativados com PHA;
- 1 µg/mL de extrato de açaí reduz a produção do inflamassoma NLRP3 e da caspase 1, o que supostamente inibe a ativação da cascata inflamatória.

O conjunto dos resultados sugere que o açaí possui a capacidade de prevenir ou reverter a disfunção mitocondrial no complexo I e o estresse oxidativo de células neuronais-like, bem como apresenta efeito anti-inflamatório via modulação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos. Estes resultados sugerem que a matriz desta planta poderia ser utilizada para o desenvolvimento de fármacos voltados ao tratamento de pacientes com transtorno bipolar, uma vez que doenças neuropsiquiátricas, destacando-se o transtorno bipolar estão relacionadas à disfunção mitocondrial no complexo I da cadeia de transporte de elétron e à inflamação crônica.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system, 4th ed. **Elsevier Saunders, Philadelphia**. 2014.
- ABBAS, S. R.; SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Food Chemistry**. v.147, p. 10-16, 2014.
- AKISKAL, H. S. Mood disorders: Historical introduction and conceptual overview. In: Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry, 9ª Ed, LWW, p.1630-45, 2009.
- AKISKAL, H. S.; BENAZZI, F. The DSM-IV and ICD-10 categories of recurrent [major] depressive and bipolar II disorders: evidence that they lie on a dimensional spectrum. **Journal of Affective Disorders**. v. 96, p. 45-54, 2006.
- AKISKAL, H. S.; PINTO, O. The evolving bipolar spectrum: of Depression. Prototypes I, II, III, IV. **The Psychiatric Clinics of North America**. v. 22, p. 517-134, 1999.
- ALBUQUERQUE, L. Guaraná: A vitalidade em grãos. **Amazônia em Foco**, p. 9-14, 1991.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 3ª Ed., DSM-III. Washington, DC: **American Psychiatric Association**, 1980.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Text Revision, 4th Ed., DSM-IV-TR. Washington, DC: **American Psychiatric Association**, 2000.
- AN, F.; YANG, G.; TIAN, J.; WANG, S. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in d-galactose-aged mice. **Neural Regeneration Research**. v. 7, p. 2565-2575, 2012.
- ANDRADE, L. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 48, p. 342-355, 2008.
- ANDREAZZA, A. C.; FREY, B. N.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; ROMBALDI, F.; SANTIN, A.; GONÇALVES, C. A.; KAPCZINSKI, F. DNA Damage In Bipolar Disorder. **Psychiatry Research**. v. 153, p. 27-32, 2007.

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 of General Psychiatry**. v. 67, p. 360-368, 2010.

ANGST, J.; GAMMA, A. A new bipolar spectrum concept: a brief review. **Bipolar Disorder**. v. 4, Suppl 1, p. 11-14, 2002.

ANGST, J.; GAMMA, A.; BENAZZI, F.; AJDACIC, V.; EICH, D.; RÖSSLER, W. Toward a redefinition of subthreshold bipolarity: epidemiology and proposed criteria for bipolar-II, minor bipolar disorders and hypomania. **Journal of Affective Disorders**. v. 73, p. 133-146, 2003.

Associação Brasileira de Transtorno Bipolar (ABTB), 2013. Acessado em: 10 de dezembro de 2015. Disponível em: [www.abrata.gov.br](http://www.abrata.gov.br).

ATKIN, T. A.; MACASKILL, A. F.; BRANDON, N. J.; KITTLER, J. T. Disrupted in Schizophrenia-1 regulates intracellular trafficking of mitochondria in neurons. **Molecular Psychiatry**. v. 16, p. 122-124, 2011.

AUFFRAY, C.; FOGG, D.; GARFA, M.; ELAIN G.; JOIN-LAMBERT, O.; KAYAL, S.; SARNACKI, S.; CUMANO, A.; LAUVAU, G.; GEISSMANN, F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science**. v. 3, p. 666-670, 2007.

BAI, Y. M.; SU, T. P.; TSAI, S. J.; WEN-FEI, C.; LI, C. T.; PEI-CHI, T.; MU-HONG, C. Comparison of inflammatory cytokine levels among type I/type II and manic/hypomanic/euthymic/depressive states of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**. v. 166, p. 187-192, 2014.

BAI, Y. M.; SU, T. P.; LI, C. T.; TSAI, S. J.; CHEN, M. H.; TU, P. C.; CHIOU, W. F. Comparison of pro-inflammatory cytokines among patients with bipolar disorder and unipolar depression and normal controls. **Bipolar Disorders**. v. 17, p. 269-277, 2015.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Seminars in Cancer Biology**. v. 22, p. 33-40, 2012.

BARBOSA, P. O.; PALA, D.; SILVA, C. T.; OLIEVEIRA DE SOUZA, M.; FERREIRA DO AMARAL, J.; LIMA VIEIRA, R. A.; ANDREZZA DE FREITAS FOLLY, G.; PINHEIRO VOLP, A. C.; NASCIMENTO DE FREITAS, R. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**. v. 29, p. 1-7, 2016.

BARNES, D. E.; LINDAHL, T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annual Review of Genetics**. v. 38, p. 445-476, 2004.

BASHA, S. J.; SHETTY, N. R.; DEVARBHAVI, H.; Pernicious anaemia with gastric carcinoids. **The Journal of the Association of Physicians of India**. v. 64, p. 76-77, 2016.

BAUER, M. S.; ALTSHULER, L.; EVANS, D. R.; BERESFORD, T.; WILLIFORD, W. O.; HAUGER, R. Prevalence and distinct correlates of anxiety, substance, and combined comorbidity in a multi-site public sector sample with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**. v. 85, p. 301-315, 2005.

BAXTER, A. J.; PATOTN, G.; SCOTT, K. M.; DEGENHARDT, L.; WHITEFORD, H. A. Global epidemiology of mental disorders : what are we missing? **PlosOne**. v. 8, p. 1-9, 2013.

BENAZZI, F. Bipolar II Disorder: epidemiology, diagnosis and management. **CNS Drugs**. v. 21, p. 727-740, 2007.

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 and Biobehavioral Reviews**. v. 35, p. 804-817, 2011.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**. v. 441, p. 235-238, 2006.

BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; DOS SANTOS, G. F.; ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E.; SOARES, F. A.; BARBISAN, F.; ATHAYDE, M. L.; CRUZ, I. B. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chem. Toxicol.** v.53, p. 119-125, 2013.

BÓDEN, R.; EDMAN, G.; ÖSBY, U. A comparison of cardiovascular risk factors for ten antipsychotic drugs in clinical practice. **Neuropsychiatric disease**. v. 9, p. 371-377, 2013.

BOURDY, G.; DEWALT, S. J.; MICHEL, L. R. C.; ROCA, A.; DEHARO, E.; MUÑOZ, V.; BALDERRAMA, L.; QUENEVO, C.; GIMENEZ, A. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 70, P. 87-109, 2000.

BOYADJIEVA, N.; VARADINOVA, M.; Epigenetics of psychoactive drugs. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 64, p. 1349-1358, 2012.

BRADDOCK, M.; QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 3, p. 330-339, 2004.

BRAZIER-HICKS, K. M.; EVANS, M. C.; GERSHATER, H.; PUSCHMANN, P. G.; STEEL, R.; EDWARDS, R. The C-glycosylation of flavonoids in cereals. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 284, p. 17926–17934, 2009.

BRIETZKE, E.; STERTZ, L.; FERNANDES, B. S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; MASCARENHAS, M.; ESCOSTEGUY VARGAS, A.; CHIES, J. A.; KAPCZINSKI, F. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**. v. 116, p. 214-217, 2009.

BROWN, N. C.; ANDREAZZA, A. C.; YOUNG, L. T. An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder. **Psychiatry Research**. v. 218, p. 61-68, 2014.

BYDŁOWSKI, S. P.; D'AMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. An aqueous extract of guaraná (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 24, p. 421-424, 1991.

CADONÁ, F. C.; MACHADO, A. K.; AZZOLIN, V. F.; BARBISAN, F.; DORNELLES, E. B.; WERNER, G.; GONÇALVES, P. D. B.; ASSMANN, C. E.; RIBEIRO, E. E.; da CRUZ, I. B. M. Guaraná a caffeine-rich food increase oxaliplatin sensitivity of colorectal HT-29 cells by apoptosis pathway modulation. **Anti-Cancer Agents and Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 1055-1065, 2016.

CAMPOS, S. D. S.; BOVI, M. L. A.; IADEROZA, M. Characterization of palm heart harvested from several crossing combinations between *E. oleracea* Mart and *E. edulis* Mart growing under different conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 26, p. 637–646, 1991.

CLAY, H. B.; SILLIVAN, S.; KONRADI, C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 29, p. 311-324, 2011.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews: Immunology**. v. 10, p. 826-837, 2010.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. **Molecular Cell**. v. 54, p. 281-288, 2014.

CIPRIANI, A.; PRETTY, H.; HAWTON, K.; GEDDEN, J. R. Lithium in the prevention of suicidal behavior and all-cause mortality in patients with mood disorders: a systematic review of randomized trials. **The American Journal of Psychiatry**. v. 162, p. 1805–1819, 2005.

COSTA KREWER, C.; RIBEIRO, E. E.; RIBEIRO, E. A.; MORESCO, R. N.; DA ROCHA, M. I. U. M.; SANTOS MONTAGNER, G. F.; MACHADO, M. M.; VIEGAS, K.; BRITO, E.; CRUZ, I. B. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytotherapy Research**. v. 25, p. 1367-1374, 2011.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, J. R. D.; ARAUJO, J.; SALMAZI, K.; KALLAS, E.; RABOLLI, V.; LISON, D.; HUAUX, F. The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1 $\beta$  processing in response to inhaled particles. **Particle and Fibre Toxicology**. v. 13, 2015.

CURRAN, G.; RAVINDRAN, A. Lithium for bipolar disorder: a review of the recent literature. **Expert Review of Neurotherapeutics**. v. 14, p. 1079–1098, 2014.

COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; PIANA, G.; CAPASSO, M.; ARLORIO, M. Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**. 2005;38:893–897, 2005.

COLD, D. E. The relationship between cerebral metabolic rate of oxygen and cerebral blood flow in the acute phase of head injury. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. v. 30, p. 453-457, 1986.

CORRELL, C.U.; SCHRIDAN, E.M.; DELBELLO, M.P.; Antipsychotic and mood stabilizer efficacy and tolerability in pediatric and adult patients with bipolar I mania: a comparative analysis of acute randomized, placebo-controlled trials. **Bipolar Disorder**. v. 12, p. 116-141, 2010.

Da Costa L.A., Badawi A., El-Sohemy A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 60, p. 27-36, 2012.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annual Review in Immunology**. v. 29, p. 707-735, 2011.

DEL PORTO, J. A.; DEL PORTO, K. O. História da caracterização nosológica do transtorno bipolar. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v. 32, Suppl 1, p. 7-14, 2005.

DHANDE, I.; MA, W.; HUSSAIN, T. Angiotensin AT2 receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production. **Hypertension Research**. v. 38, p. 21-29, 2015.

DIAS, M. M.; MARTINO, H. S.; NORATTO, G.; ROQUE-ANDRADE, A.; STRINGHETA, P. C.; TALCOTT, S.; RAMOS, A. M.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. **Food Function**. v. 6, p. 3249-3256, 2015.

DINARELLO, C. A. Inflammation in human disease: anticytokine therapy. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. v. 15, p. 134-136, 2008.

DONG, Z.; SHANG, H.; CHEN, Y. Q.; PAN, L. L.; BHATIA, M.; SUN, J. Sulforaphane protects pancreatic acinar cell injury by modulating Nrf2-mediated oxidative stress and NLRP3 inflammatory pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, 2016.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALIA, J.; HYARIC, M. L.; ALMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. **Analytica Chimica Acta**. v. 532, p. 177-186, 2005.

EMSLEY, R.; CHILIZA, B.; ASMAL, L.; HARVEY, B. H. The nature of relapse in schizophrenia. **BMC Psychiatry**. v. 13p. 50, 2013.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 55, p. 223-229, 1997.

FAHY, R. J.; DOSEFF, A. I.; WEWERS, M. D. Spontaneous human monocytes apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is dependent of caspase-1. **Journal of Immunology**. v. 15, p. 1755-1762, 1999.

FITO, M. L. A.; TORRE, R.; FARRE-ALBALADEJO, M.; KHYMENETZ, O.; MARRUGAT, J.; COVAS, M. I. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. **Annali dell' Instituto Superiore di Sanita**. v. 43, p. 375-381, 2007.



FOO, Y. Z.; NAKAGAWA, S.; RHODES, G.; SIMMONS, L. W. The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. **Biological Reviews: Cambridge Philosophical Society**. v. 2016, p. 000-000, 2016.

FORD, C. T.; RICHARDSON, S.; MCARDLE, F.; LOTITO, S. B.; CROZIER, A.; MCARDLE, A.; JACKSON, M. J. Identification of (poly)phenol treatment that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. **The British Journal of Nutrition**. v. 115, p. 1699-1710, 2016.

FRANCES A, JONES KD. Bipolar disorder type II revisited. **Bipolar Disorder**. v. 14, p. 474-477, 2012.

GHAEMI, S. N.; SACHS, G. S.; CHIOU, A. M.; PANDURANGI, A. K.; GOODWIN, F. K. Is bipolar disorder still underdiagnosed? Are antidepressants overutilized? **Journal of Affective Disorders**. v. 52, p. 135-144, 1999.

GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton reagents. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 15, p. 435-445, 1993.

GONG, Z.; ZHOU, J.; LI, H.; GAO, Y.; XU, C.; ZHAO, S.; CHEN, Y.; CAI, W.; WU, J. Curcumin suppresses MLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 59, p. 2132-2142, 2015.

GOODWIN, G.M. Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder re-revised second edition—recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**. v. 23, p. 346–388, 2009.

GORDON, S.; MARTINEZ, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**. v. 32, p. 593–604, 2010.

GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. **Cell Death and Disease**. v. 6, 2011.

GOULDING, M.; SMITH, N. Palms: palms in Amazon wetland. In: Sentinels for Amazon Conservation. **Amazon Conservation Association**. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, p. 121–146, 2007.

GRUNZE, H.; VIETA, E.; GOODWIN, G. M.; BOWDEN, C.; LICHT, R. W.; MÖLLER, H.-J.; KASPER, S. Task Force On Treatment Guidelines For Bipolar Disorders. The World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for the Biological

Treatment of Bipolar Disorders: Update 2010 on the treatment of acute bipolar depression  
The World Journal of Biological. **Psychiatry**. v. 11, p. 81-109, 2010.

GUERRA, J. F. C.; MAGALHAES, C. L. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v. 49, p. 188-194, 2011.

HAMDANI, N.; DOUKHAN, R.; KURTLUCAN, O.; TAMOUZA, R.; LEBOYER, M. Immunity, inflammation, and bipolar disorder: diagnostic and therapeutic implications. **Current Psychiatry Reports**. v. 15, p. 387, 2013.

HANAMSAGAR, R.; HANKE, M. L.; KIELIAN, T. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. **Trends in Immunology**. v. 33, p. 333-342, 2012.

HEYKANTS, J.; HUANG, M. L.; MANNENS, G.; MEULDERMANS, W.; SNOECK, E.; VAN BEIJSTERVELDT, L.; VAN PEER, A.; WOESTENBORGH, R. The pharmacokinetics of risperidone in humans: a summary. **The Journal of Clinical Psychiatry**. v. 55, p. 13-17, 1994.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. **Free Radical Research**. v. 31, p. 75-80, 1999.

HOU, L.; XIONG, N.; LIU, L.; HUANG, J.; HAN, C.; ZHANG, G.; LI, J.; XU, X.; LIN, Z.; WANG, T. Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via autophagy enhancement. **BMC Neuroscience**. v. 16, p. 1-10, 2015.

HOWELL, E. G. M.; FARWELL, D. W.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALIA, J. M.; HYARIC, M. L.; AMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guaraná and some extracts. **Analytica Chimica Acta**. v. 532, p. 177-186, 2005.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. **Cell**. v. 126, p. 1121-1133, 2006.

JAKOBSSON, J.; BJERKE, M.; SAHEBI, S.; ISGREN, A.; EKMAN, C. J.; SELLGREN, C.; OLSSON, B.; ZETTERBERG, H.; BLENNOW, K.; PALSSON, E.; LANDÉN, M. Monocyte and microglial activation in patients with mood-stabilized bipolar disorder. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**. v. 40, p. 250-258, 2015.

JANICK, J.; PAUL, R. Areaceae. In: Encyclopedia of Fruits and Nuts. CABI, Cambridge, MA, p. 128–130, 2008.

JANSSENS, S.; PULENDRAN, B.; LAMBRECHT, B. Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. **Nature Immunology**. v. 15, p. 910-919, 2014.

JENSEN, G. S.; AGER, D. M.; REDMAN, K. A.; MITZNER, M. A.; BENSON, K. F.; SCHAUSS, A. G. Pain Reduction And Improvement In Range Of Motion After Daily Consumption Of An Açai (Euterpe Oleracea Mart.) Pulp–Fortified Polyphenolic-Rich Fruit And Berry Juice Blend. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, p. 702–11, 2011.

JOBIM, M. L.; SANTOS, R. C.; dos SANTOS ALVES, C. F.; OLIVEIRA, R. M.; MOSTARDEIRO, C. P.; SAGRILLO, M. R.; de SOUZA FILHO, O. C.; GARCIA, L. F.; MANINCA-CATTANI, M. F.; RIBEIRO, E. E.; da CRUZ, I. B. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extract and its association to oxidative metabolism. **Microbiological Research**. v. 169, p. 314-323, 2014.

JOHANNESSEN, C. U. Mechanisms of action of valproate: a commentary. **Neurochemistry International**. v. 37, p. 103-110, 2000.

JOHANNESSEN, C. U.; JOHANNESSEN, S. I. Valproate: past, present, and future. **CNS Drug Rev**. v. 9, p. 199-216, 2003.

JUDD, L. L.; AKISKAL, H. S.; SCHETTLER, P. J.; ENDICOTT, J.; MASER, J.; SOLOMON, D. A.; LEON, A. C.; RICE, J. A.; KELLER, M. B. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. **Archives of General Psychiatry**. v. 59, p. 530-37, 2002.

JUDD, L. L.; AKISKAL, H. S.; SCHETTLER, P. J.; CORYELL, W.; ENDICOTT, J.; MASER, J. D.; SOLOMON, D. A.; LEON, A. C.; KELLER, M. B. A prospective investigation of the natural history of the long-term weekly symptomatic status of bipolar II disorder. **Archives of General Psychiatry**. v. 60, p. 261-269, 2003.

JUDD, L. L.; SCHETTLER, P. J.; AKISKAL, H. S.; CORYELL, W.; LEON, A. C.; MASER, J. D.; SOLOMON, D. A. . Residual symptom recovery from major affective episodes in bipolar disorders and rapid episode relapse/recurrence. **Archives of General Psychiatry**. v. 65, p. 386-394, 2008.

KAKIUCHI, C.; ISHIGAKI, S.; OSLOWSKIL, C. M.; FONSECA, S. G.; KATO, T.; URANO, F. Valproate, a Mood Stabilizer, Induces WFS1 Expression and Modulates Its Interaction with ER Stress Protein GRP94. **PlosOne**. v. 4, p. 1-6, 2009.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities Of Açai (Euterpe Precatoria Mart.) Fruit Pulp , Superior Antioxidant And Anti-Inflammatory Properties To Euterpe Oleracea Mart. **Food Chemistry**. v. 133, p. 671–77, 2012.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp and their antioxidante and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**. v. 128, p. 152-157, 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**. v. 11, p. 373-384, 2010.

KIDANE, D.; CHAE, W. J.; CZOCHOR, J.; ECKERT, K. A.; GLAZER, P. M.; BOTHWELL, A. L.; SWEASY, J. B. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 49, p. 116-139, 2014.

KIM, H. K.; ANDREAZZA, A. C.; ELMI, N.; CHEN, W.; YOUNG, L. T. Nod-like receptor pyrin containing 3 (NLRP3) in the post-mortem frontal cortex from patients with bipolar disorder: a potential mediator between mitochondria and immune-activation. **Journal of Psychiatric Research**. v. 72, p. 43-50, 2016.

KIM, H. K.; CHEN, W.; ANDREAZZA, A. C. The Potential Role Of The NLRP3 Inflammasome As A Link Between Mitochondrial Complex I Dysfunction And Inflammation In Bipolar Disorder. **Neural Plasticity**. v. 2015, p. 1-10, 2015.

KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. v. 12, p. 449-457, 2001.

KLEINER, J., ALTSCHULER, L., HENDRICK, V., HERSHMAN, J.M. Lithium-induced subclinical hypothyroidism: review of the literature and guidelines for treatment. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 60, p. 249–255, 1999.

KLIMACZEWSKI, C.V.; SARAIVA, R.A.; ROOS, D.H.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; KAMDEM, J.P.; BARBOSA, N.V.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)- citrate in rat liver mitochondria in vitro. **Industrial Crops and Products**. v. 54, p. 240-247, 2014.

KLINGER, G.; STAHL, B.; FUSAR-POLI, P.; MERLOB, P. Antipsychotic drugs and breastfeeding. **Pediatric Endocrinology Reviews**. v. 10, p. 308-317, 2013.

KONRADI, C.; SILLIVAN, S. E.; CLAY, H. B. Mitochondria, oligodendrocytes and inflammation in bipolar disorder: evidence from transcriptome studies points to intriguing parallels with multiple sclerosis. **Neurobiology of Disease**. v. 45, p. 37-47, 2012.

KOUKOPOULOS, A.; REGINALDI, D.; MINNAI, G.; SERRA, G.; PANI, L.; JOHNSON, F. N. The long term prophylaxis of affective disorders. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**. v. 49, p. 127-147, 1995.

KRALISCH, S.; FASSHAUER, M. Adipocyte fatty acid binding protein: A novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? **Diabetologia**. v. 56, p. 10-21, 2013.

KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCÍA, A. A.; TRONCOSO, G. A. M.; Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de La facultad de Química Farmacéutica**. v. 12, p. 45-52, 2005.

LASSER, K.; BOYD, J. W.; WOOLHNADER, S.; HIMMELSTEIN, D. U.; McCORMICK, D.; BOR, D. H. Smoking and mental illness: a population-based prevalence study. **JAMA**. v. 284, p. 2606-2610, 2000.

LAW, B. N.; LING, A. P.; KOH, R. Y.; CHYE, S. M.; WONG, Y. P. Neuroprotective effects of orientin on hydrogen peroxide induced apoptosis in SHSY5Y cells. **Molecular Medicine Reports**. v. 9, p. 947-954, 2014.

LAVIERI, R.; PICCIOLI, P.; CARTA, S.; DELFINO, L.; CASTELLANI, P.; RUBARTELLI, A. TLR costimulation causes oxidative stress with unbalance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines production. **Journal of Immunology**. v. 192, p. 5373-5381, 2014.

LEBOYER, M.; SORECA, I.; SCOTT, J.; FRYE, M.; HENRY, C.; TAMOUZA, R.; KUPFER, D. J.; Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease? **Journal of Affective Disorders**. v. 141, p. 1-10, 2012.

LEMASTERS, J. J. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Target Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. **Rejuvenation Research**. v. 8, p. 3-5, 2005.

LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell Metab**. v. 17, p. 491-506, 2013.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**. v. 443, p. 787-795, 2006.

LLERENA, A.; BERECZ, R.; PEÑAS-LLEDÓ.; SÜVEGES, A.; FARIÑAS, H. Pharmacogenetics of clinical response to risperidone. **Pharmacogenomics**. v. 14, p. 177-194, 2013.

LOEB, L. A. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. **Nature Review Cancer**. v. 11, p. 450-457, 2011.

LÓPEZ-ARMADA, M. J.; RIVEIRO-NAVEIRA, R. R.; VAAMONDE-GARCÍA, C.; VALCPARCEL-ARES, M. N. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. **Mitochondrion**. v. 13, p. 106-118, 2013.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; VIETA, E.; RUBIO, G.; GARCÍA-GRACÍA, P.; ALAMO, C. Bipolar disorder as an emerging pathology in the scientific literature: A bibliometric approach. **Journal of Affective Disorders**. v. 92, p. 161-170, 2006.

MACHADO, A. K.; CADONA, F. C.; AZZOLIN, V. F.; DORNELLES, E. B.; BARBISAN, F.; RIBEIRO, E. E.; MANICA-CATTANI, M. F.; DUARTE, M. M. M. F.; SALDANHA, J. R. P.; da CRUZ, I. B. M. Guarana (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**. v. 67, p.426-433, 2015.

MACHADO, A. K.; PAN, A. Y.; DUONG, A.; da SILVA, T. M; ANDREAZZA, A. C. Upstream pathways controlling mitochondrial function in major psychosis: a focus on bipolar disorder. **Canadian Journal of Psychiatry**. v. 61, 2016.

MAES, M.; RUCKOANICH, P.; CHANG, Y. S.; MAHANONDA, N.; BERK, M. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD) and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 35, p. 769-783, 2011.

MALKUS, K. A.; TSIKA, E.; ISCHIROPOULOS, H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. **Molecular Neurodegeneration**. v. 4, p. 1-16, 2009.

MALHI, G. S.; TANIOUS, M.; DAS, P.; COULSTON, C. M.; BERK, M. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. Current understanding. **CNS Drugs**. v. 27, p. 135-153, 2013.

MANJI, H.; KATO, T.; DI PROSPERO, N. A. NESS, S.; BEAL, M. F.; KRAMS, M.; CHEN, G. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 2012, p. 293-307, 2012.

MARKOWITZ, G. S.; RADHAKRISHNAN, J.; KAMBHAM, N.; VALERI, A. M.; HINES, W. H.; D'AGATI, V. D. Lithium nephrotoxicity: a progressive combined glomerular and tubulointerstitial nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 11, 1439–1448, 2000.

MARTINON, F.; CHEN, X.; LEE, A. H.; GLIMCHER, L. H. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. **Nature Immunology**. v. 11, p. 411-418, 2010.

MASELLA, R.; BENEDETTO, R. D.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel Mechanisms Of Natural Antioxidant Compounds In Biological Systems: Involvement Of Glutathione And Glutathione-Related Enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 16, p. 577– 586, 2005.

MATHEUS, M. E.; de OLIVEIRA, S. B.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; MENEZES, F. S.; FERNANDES, P. D. Inhibitory effects of Euterpe oleracea Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 107, p. 291–296, 2006.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; ZAKARIA, Z. A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **Journal of Food Science and Technology**. v. 52, p. 5790-5798, 2015.

MATZA, L. S.; RAJAGOPALAN, K. S.; THOMPSON, C. L.; LISSOVOY, G. Misdiagnosed patients with bipolar disorder: comorbidities, treatment patterns, and direct treatment costs. **The Journal of Clinical Psychiatry**. v. 66, p. 1432-1440, 2005.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, p. 301-305, 2002.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428-435, 2008.

MOSTARDEIRO, C. P.; MOSTARDEIRO, M. A.; MOREL, A. F.; OLIVEIRA, R. M.; MACHADO, A. K.; LEDUR, P.; CADONA, F. C.; da SILVA, U. F.; MANICA DA CRUZ, I. B. The Pavonia xanthogloea (Ekman, Malvaceae): Phenolic compounds quantification, anti-oxidant and cytotoxic effect on human lymphocytes cells. **Pharmacognosy Magazine**. v. 10, 2014.

MOYLAN, S.; BERK, M.; DEAN, O. M.; SAMUNI, Y.; WILLIAMS, L. J.; O'NEIL, A.; HAYLEY, A. C.; PASCO, J. A.; ANDERSON, G.; JACKA, F. N.; MAES, M. Oxidative & Nitrosative Stress In Depression: Why So Much Stress? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 45, p. 46-62, 2014.

MUÑIZ-MIRET, N.; VAMOS, R.; HIRAOKA, M.; MONTAGNINI, F.; MENDELSON, R. O. The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the floodplains of the Amazon estuary. Pará, Brazil. **Forest Ecology Management**. v. 87, p. 163-173, 1996.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D.; editors. The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge, MA: Harvard School of Public Health on behalf of the World Health Organization and the World Bank, 1996.

NAKAHIRA, K.; HASPEL, J. A.; RATHINAM, V. A. K.; LEE, S.-J.; DOLINAY, T.; LAM, H. C.; ENGLERT, J. A.; RABINOVITCH, M.; CERNADAS, M.; KIM, H. P.; FITZGERALD, K. A.; RYTER, S. W.; CHOI, A. M. K. Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release. **Nature Immunology**. v. 12, p. 222-230, 2011.

NARAYAN, S.; TANG, B.; HEAD, S. R.; GILMARTIN, T. J.; SUTCLIFFE, J. G.; DEAN, B.; THOMAS, E. A. Molecular profiles of schizophrenia in the CNS at different stages of illness. **Brain Research**. v. 1239, p. 235-248, 2008.

National Collaborating Centre of Mental Health (UK) Bipolar Disorder. Leicester, UK; The British Psychological Society and Gaskell; 2006.

NORATTO, G. D.; ANGEL-MORALES, G.; TALCOTT, S. T.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 7999-8012, 2011.



O'CONNELL, R. M.; KAHN, D.; GIBSON, W. S.; ROUND, J. L.; SCHOLZ, R. L.; CHAUDHURI, A. A.; KAHN, M. E.; RAO, D. S.; BALTIMORE, D. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. **Immunity**. v. 33, p. 607-619, 2010.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – Décima Revisão (CID-10)*, São Paulo, EDUSP/ Centro Colaborador da OMS para Classificação de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde, 1993.

PADMOS, R. C.; HILLEGERS, M. H.; KNIJFF, E. M.; VONK, R.; BOUVY, A.; STAAL, F. J.; de RIDDER, D.; KUPKA, R. W.; NOLEN, W. A.; DREXHAGE, H. A. A discriminating messenger RNA signature for bipolar disorder formed by an aberrant expression of inflammatory genes in monocytes. **Archives of General Psychiatry**. v. 65, p. 395-407, 2008.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L.; SILVA, A. C.; da SILVA, R. M.; SEVENINI, L. A.; de MELO, H. A.; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRINO-SANTOS, T.; Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 11, p. 96-102, 2012.

PARSONS, B.; ALLLISON, D.; LOEBEL, A.; WILLIAMS, K.; GILLER, E.; ROMANO, S.; SIU, C. Weight effects associated with antipsychotics: a comprehensive database analysis. **Schizophrenia Research**. v. 120, p. 103-110, 2009.

PERÄLÄ, J.; SUVISAARI, J.; SAARNI, S. I.; KUOPPASALMI, K.; ISOMETSÄ, E.; PIRKOLA, S.; PARTONEN, T.; TUULIO-HENRIKSSON, A.; HINTIKKA, J.; KIESEPPÄ, T.; HÄRKÄNEN, T.; KOSKINEN, S.; LÖNNQVIST, J. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. **Archives of General Psychiatry**. v. 64, p. 19-28, 2007.

PESSOA, J. D. C.; da SILVA E SILVA, P. V. Effect of temperature and storage on açai (*Euterpe oleracea*) fruit water uptake. Stimulation of fruit transportation and pre processing. **Fruits**. v. 62, p. 295-301, 2007.

POPOVIC, M.; CABALLERO-BLEDA, M.; BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats. **Journal of Psychopharmacology**. v. 28, p. 498-501, 2014.

POST, R. M.; LEVERICH, G. S. Treatment of bipolar illness: A casebook for clinicians and patients. New York: W.W. Norton & Company, 2008.

POULOSE, S. M.; FISHER, D. R.; LARSON, J.; BIELINSKI, D.F.; RIMANDO, A. M.; CAREY, A. N.; SCHAUSS, A. G.; SHUKITT-HALE, B. Anthocyanin-rich Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Pulp Fractions Attenuate Inflammatory Stress Signaling in Mouse Brain BV-2 Microglial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 1084-1093, 2012.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Diet and Health Implications. **HortScience**. v. 35, p. 588-592, 2000.

QIU, Y. Y.; TANG, L. Q. Roles of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Pharmacological Research**. v. 114, p. 251-264, 2016.

RAMOS, M. G.; ROCHA, F. L.; Eficácia e segurança dos antipsicóticos atípicos nas demências: uma revisão sistemática. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**. v. 55, n. 3, 2006.

RAO, J. S.; HARRY, G. J.; RAPOPORT, S. I.; KIM, H. W. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. **Molecular Psychiatry**. v. 15, p. 384-392, 2010.

RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M.; AISSA, A. F.; DARIN, J. D.; DEROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**. v. 695, p. 22-28, 2010.

RIEDEL, M.; SCHARZ, M. J.; STRASSNIG, M. Risperidone plasma level, clinical response and side-effects. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**. v. 255, p. 261-268, 2005.

RIZZUTO, R.; DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A.; MAMMUCARI, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 13, p. 566-578, 2012.

ROCHA, A. P.; CARVALHO, L. C.; SOUSA, M. A.; MADEIRA, S. V.; SOUSA, P. J.; TANO, T.; SCHINI-KERTH, V. B.; RESENDE, A. C.; SOARES DE MOURA, R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**. v. 46, p. 97-104, 2007.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. v. 21, p. 111-127, 2007.

ROSENFELDT, F.; WILSON, M.; LEE, G.; KURE, C.; OU, R.; BRUAN, L.; HAAN, J. Oxidative Stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**. v. 48, p. 45-54, 2013.

ROSENBERG, G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? **Cellular and Molecular Life Science**. v. 64, p. 2090-2103, 2007.

ROSHANAEI-MOGHADDAM, B.; KATON, W. Premature mortality from general medical illnesses among persons with bipolar disorder: a review. **Psychiatric Services**. v. 60, p. 147-156, 2009.

ROVED, J.; WESTERDAHL, H.; HASSELQUIST, D. Sex differences in immune responses: hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. **Hormones and Behavior**. v. 16, p. 1-61, 2016.

RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A. L.; ROUMY, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malária. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 133, p. 917-921, 2011.

RUPÉREZ, A. I.; GIL, A.; AGUILERA, C. M. Genetics of oxidative stress in obesity. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 15, p. 3118-3144, 2014.

RYAN, M. M.; LOCKSTONE, H. E.; HUFFAKER, S. J.; WAYLAND, M. T.; WEBSTER, M. J.; BAHN, S. Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. **Molecular Psychiatry**. v. 11, p. 965-978, 2006.

SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F.; de SOUZA FILHO, O. C.; DUARTE, M. M.; RIBEIRO, E.E., CADONA, F. C.; da CRUZ, I.B. Tucuma fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**. v.172, p. 741-748, 2015.

SAIGO, K.; YOSHIDA, K.; IKEDA, R.; SAKAMOTO, Y.; MURAKAMI, Y.; URASHIMA, T.; ASANO, T.; KENMOCHI, T.; INOUE, I. Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. **Human Mutation**. v. 29, p. 703-708, 2008.

SALEH, M.; MATHISON, J. C.; WOLINSKI, M. K.; BENCINGER, S. J.; FITZGERALD, P.; DROIN, N.; ULEVITCH, R. J.; GREEN, D. R. NICHOLSON, D. W. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspa se-12-deficient mice. **Nature**. v. 440, p. 1064-1068, 2006.

SALLET, P. C.; GATTAZ, W. F. Classificação das psicoses endógenas de Karl Leonhard. **Revista de Psiquiatria Clínica**. V. 25, p. 22-25, 1998.

SANTO-DOMINGO J, DEMAUREX N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1797, p. 907-912, 2010.

SANTOS, M. F.; MAMEDE, R. V.; RUFINO, M. S.; de BRITO, E. S.; ALVES, R. E. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. **Antioxidants**. v. 4, p. 591-602, 2015.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**. v. 12, p. 784-788, 2000.

SCHNEIDER, M. R.; KLEIN, C. C.; WEBER, W.; BITTER, S. M.; ELLIOTT, K. B.; STRAKOWSKI, S. M.; ADLER, C. M.; DELBELLO, M. P. The effects of carbamazepine on prefrontal activation in mania youth with bipolar disorder. **Psychiatry Research**. v. 223, p. 268-27, 2014.

SCHRECKINGER, M. E.; LOTTON, J.; LILA, M. A.; MEJIA, E. G. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal of Medicinal Food**. v. 13, p. 233-246, 2010.

SCOLA, G.; LALIBERTE, V. L. M.; KIM, H. K.; PINGUELO, A.; SALVADOR, M.; YOUNG, L. T.; ANDREAZZA, A. C. Vitis Labrusca Extract Effects On Cellular Dynamics And Redox Modulations In A SH-SY5Y Neuronal Cell Model: A Similar Role To Lithium. **Neurochemistry International**. v. 79, p. 12-19, 2014.

SCOLA, G.; KIM, H. K.; YOUNG, L. T.; ANDREAZZA, A. C. A fresh look at complex i in microarray data: Clues to understanding disease-specific mitochondrial alterations in bipolar disorder. **Biological Psychiatry**. v. 73, p. e4-e5, 2013.

SCHIMPL, F. C.; da SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F. MAZZAFERA, P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 150, p. 14-31, 2013.

SIDIROPOULOS, P. I.; GOULIELMOS, G.; VOLOUDAKIS, G. K.; PETRAKI, E.; BOUMPAS, D. T. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 67, p. 1382-1399, 2008.

SILVA, D. F.; VIDAL, F. C.; SANTOS, D.; COSTA, M. C.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO, M.; DE MOURA, R. S. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 14, p.1-9, 2014.

SILVA, H. Socio-ecology of health and disease: the effects of invisibility on the caboclo populations of the Amazon. In: *Amazon Peasant Societies in a Changing Environment* (Adams C, Murrieta R, Neves W, Harris M, eds.). Springer, Dordrecht, the Netherlands, v. 2008, p. 307–333, 2008.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BORQUEZ, J.; KENNELLY, E. J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**. v. 18, p. 1672–1692, 2013.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's Journey from Region Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 7, p. 279-282, 2010.

SOUZA FILHO, O. C.; SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F.; MACHADO, A. K.; CADONA, F.; RIBEIRO, E. E.; DUARTE, M. M.; MOREL, A. F.; da CRUZ, I. B. The in vitro effect of *Tucuma* (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian fruit rich in carotenoids. **Journal of Medicinal Food**. v. 16, p. 1013-1021, 2013.

SOUZA-MONTEIRO, J. R.; HAMOY, M.; SANTANA-COELHO, D.; ARRIFANO, G. P. F.; PARAENSE, R. S. O.; COSTA-MALAQUIAS, A.; MENDONÇA, J. R.; DA SILVA, R. F.; MONTEIRO, W. S. C.; ROGEZ, H.; DE OLIVEIRA, D. L.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; CRESPO-LÓPEZ, M. E. Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. **Neurochemistry International**. v. 90, p. 20-27, 2015.

SPADA, P. D.; DANI, C.; BORTOLINI, G. V.; FUNCHAL, C.; HENRIQUES, J. A.; SALVADOR, M. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **Journal of Medicinal Food**. v. 12, p. 1084-1088, 2009.

STRAKOWSKI, S. M.; FLECK, D. E.; MAJ, M. Broadening the diagnosis of bipolar disorder: benefits versus risks. **World Psychiatry**. v. 10, p. 181-186, 2011.

STRECK, E. L.; CZAPSKI, G. A.; GONÇALVES, D. A.; SILVA, C. Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2013, p. 1-2, 2013.

STROWIG, T.; HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; FLAVELL, R. Inflammasomes in health and disease. **Nature**. v. 481, p. 278-286, 2012.

STRUDWICK, J.; SOBEL, G. I. Uses of *Euterpe oleracea* Mart in the Amazon Estuary, Brazil. **Advances in Economic Botany**. v.6, p. 225-253, 1988.

STUART, M. J.; BAUNE, B. T. Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v. 42, p. 93-115, 2014.

SUN, X.; SEEBERGER, J.; ALBERICO, T.; WANG, C.; WHEELER, T. C.; SCHAUSS, A. G.; ZOU, S. Acai Palm Fruit (*Euterpe Oleracea* Mart.) Pulp Improves Survival Of Flies On A High Fat Diet. **Experimental Gerontology**. v. 45, p. 243–51, 2010.

SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 14, p. 2491-2507, 2011.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**. v. 140, p. 805-820, 2010.

TASSI, S.; CARTA, S.; DELFINO, L.; CAORSI, R.; MARTINI, A.; GATTORNO, M; RUBARTELLI, A. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1 $\beta$  secretion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 107, p. 9789-9794, 2010.

The WHO World Mental Health Survey Consortium. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **JAMA**. v. 291, p. 2581-2590, 2004.

TOKAC, D.; TUZUN, E.; GULEC, H.; YILMAZ, V.; BIRELLER, E. S.; CAKMAKOGLU, B.; KUCUKALI, C. I. Chemokine and chemokine receptor polymorphisms in bipolar disorder. **Psychiatry Investigation**. v. 13, p. 541-548, 2016.

TSAI, S. Y.; KUO, C. J.; CHUNG, K. H.; HUANG, Y. L.; LEE, H. C.; CHEN, C. C. Cognitive dysfunction and medical morbidity in elderly outpatients with bipolar disorder. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**. v. 17, p. 1004-1011, 2009.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nature Reviews Immunology**. v. 10, p. 210– 215, 2010.

TSENG, H. H.; VONG, C. T.; KWAN, Y. W.; LEE, S. M.; HOI, M. P. TRPM2 regulates TXNIP-mediated NLRP3 inflammasome activation via interaction with p47 phox under high glucose in human monocytic cells. **Scientific Reports**. v. 12, 2016.

TWIG, G.; ELORZA, A.; MOLINA, A. J.; MOHAMED, H.; WIKSTROM, J. D.; WALZER, G.; STILES, L.; HAIGH, S. E.; KATZ, S.; LAS, G.; ALROY, J.; WU, M.; PY, B. F.; YUAN, J.; DEENEY, J. T.; CORKEY, B. E.; SHIRIHAI, O. S. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **The EMBO Journal**. v. 27, p. 433-446, 2008.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 39, p. 44-84, 2007.

VICENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obesity and Metabolism**. v. 9, p. 813-839, 2007.

VIETA, E.; SANCHEZ-MORENO, J. Acute and long-term treatment of mania. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. v. 10, p. 165–179, 2008.

VIRCHOW, R. Cellular pathology as based upon physiological and pathological history. **Philadelphia: J.B. Lippincott; 1863.**

VOZAROVA, B.; STEFAN, N.; LINDSAY, R. S.; KRAKOFF, J.; KNOWLER, W. C.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; STUMVOLL, M.; WEYER, C.; TATARANNI, P. A. Low plasma adiponectin concentrations do not predict weight gain in humans. **Diabetes**. v. 51, p. 2964-2967, 2002.

WANG, J-F.; SHAO, L.; SUN, X.; YOUNG, L. T. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. **Bipolar Disorder**. v. 11, p. 523-529, 2009.

WIERSINGA, W. M. Clinical relevance of environmental factors in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease. **Endocrinology and Metabolism**. v. 31, p. 213-222, 2016.

WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W.; DZWIGALA, B.; SZPERL, M.; MARUSZYNSKI, M.; URBANOWSKA, E.; SZWECH, P.; Colony-stimulating factor 1-dependent resident macrophages play a regulatory role in fighting *Escherichia coli* fecal peritonitis. **Infection and Immunity**. v. 64, p. 1577-1581, 1996.

WILLIAMS, M. D.; SHAH, N. D.; WAGIE, A. E.; WOOD, D. L.; FRYE, M. A. Direct costs of bipolar disorder versus other chronic conditions: an employer-based health plan analysis. **Psychiatric Services**. v. 62, p. 1073-1078, 2011.

WONG, D. Y. S.; MUSGRA, V. E. I. F.; HARVEY, B. S.; SMID, S. D. Açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against  $\beta$ -amyloid exposure in vitro. **Neuroscience Letters**. v. 556, p. 221-226, 2013.

World Health Organization (2015). Acessado em: 02 de fev 2015. Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int).

World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Investing in mental health. Geneva: World Health Organization; 2003. Acessível em: Acessado em outubro/2016. Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/en/investing\\_in\\_mnh\\_final.pdf](http://www.who.int/mental_health/en/investing_in_mnh_final.pdf).

XIE, C.; KANG, J.; LI, Z.; SCHAUSS, A. G.; BADGER, T. M.; NAGARAJAN, S.; WU, T.; WU, X. The açáí flavonoid veluin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF-Kb activation and MAPK pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 23, p. 1184-1191, 2012.

YOO, H.; KU, S. K.; LEE, T.; BAE, J. S. Orientin inhibits HMGB1-induced inflammatory responses in HUVECs and in murine polymicrobial sepsis. **Inflammation**. v. 37, p. 1705-1717, 2014.

YOUNG, A. H.; NEWHAM, J. I. Lithium in maintenance therapy for bipolar disorder. **Journal of Psychopharmacology**. 20, 17-22, 2006.

ZHANG, Y.; CATTS, V. S.; SHEEDY, D.; McCROSSIN, T.; KRIL, J. J.; SHANNON WEICKERT, C. Cortical grey matter volume reduction in people with schizophrenia is associated with neuro-inflammation. **Translational Psychiatry**. v. 13, p. e982, 2016.



ZHAO, X.; GU, C.; YAN, C.; ZHANG, X.; LI, Y.; WANG, L.; REN, L.; ZHANG, Y.; PENG, J.; ZHU, Z.; HAN, Y. NALP3-inflammasome-related gene polymorphisms in patients with prehypertension and coronary atherosclerosis. **Biomed Research International**. v. 2016, 2016.

ZHOU, R.; YAZDI, A.; MENU, P.; TSCHOPP, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**. v. 469, p. 221-225, 2011.

ZHOU, Z.; ZHAI, Y.; LIANG, S.; MORI, Y.; HAN, R.; SUTTERWALA, F.; QIAO, L. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. **Nature Communications**. v. 4, 2013.