

PATRÍCIA DE SOUZA BROCARDO

**Efeitos do ácido fólico em modelos animais
de depressão e de mania**

Florianópolis

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Efeitos do ácido fólico em modelos animais
de depressão e de mania**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora em Neurociências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis

2008

*“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo.
Por isso, aprendemos sempre.”
- Paulo Freire*

“O importante é não parar de questionar” - Albert Einstein

A minha mãe por sempre ter me estimulado a ser e a querer mais na vida.

AGRADECIMENTOS

Serei sempre grata:

A “Energia” que nos move e move este planeta.

Aos meus pais pela vida e por acreditarem em mim.

As minhas irmãs “tia Ká e tia Fê” pela força com as crianças! Vocês são as melhores tias do mundo!

Ao Marcelo, meu amor nesta vida. Obrigada por ter sido sempre um ótimo companheiro e segurado as pontas sempre que precisei.

Aos nossos filhos: ter concebido vocês deu um novo e maravilhoso sentido a minha vida. Obrigada, por terem aceitado as minhas ausências, mesmo sem entender ao certo o que significa uma tese, vocês foram maravilhosos! Giulia prometo que agora iremos fazer mais “programas de meninas”.

A minha orientadora Ana Lúcia, você é responsável por minha opção pela pesquisa. Obrigada por ter sido sempre uma pessoa maravilhosa, além de uma excelente mestra!

Aos meus amigos do laboratório: Chandra, Dani, Iria, Josi, Juliano, Kelly, Luis, Manu, Mauricio e Rica obrigada pelas discussões científicas e pelas não-científicas, mas sempre prazerosas conversas. Vocês fizeram com que a minha estada no laboratório de “Neurobiologia da Depressão” fosse muito agradável.

Josi, obrigada por ter sido sempre uma companheira incansável! Foi muito bom trabalhar contigo e espero que possamos vir a trabalhar juntas num futuro BREVE!

Aos colegas que me ajudaram com os experimentos: Manu, Dani, Elo, Ké, Rica e Jéferson obrigada pela ajuda!

Ao meu colega de doutorado Sérgio Steffens pelo ácido folínico.

A todos os meus colegas da pós-graduação obrigada pelo agradável convívio, principalmente a galera das saidinhas básicas pós-lab!

As amigas, que encontrei pelo caminho, Lizia e Mah, vocês são “pessoas boas”.

As professoras Mariana e Yara e aos professores Adair e Alcir pelos trabalhos em colaboração.

Aos demais professores do programa: obrigada pelos ensinamentos.

Ao Nivaldo, secretário da pós, por ser sempre tão solícito.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DEPRESSÃO MAIOR OU UNIPOLAR	2
1.1.1. <i>Sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização celular envolvidos na fisiopatologia da depressão</i>	<i>3</i>
1.1.2. <i>Tratamento farmacológico da depressão.....</i>	<i>12</i>
1.2. TRANSTORNO BIPOLAR	13
1.2.1. <i>Sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização envolvidos na fisiopatologia do transtorno bipolar.....</i>	<i>14</i>
1.2.2. <i>Tratamento farmacológico do transtorno bipolar.....</i>	<i>18</i>
1.3. ÁCIDO FÓLICO	19
1.3.1. <i>Ácido fólico e transtornos de humor.....</i>	<i>24</i>
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. DROGAS E REAGENTES	29
4.2. ANIMAIS	29
4.3. TRATAMENTO	30
4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	30
4.4.1. <i>Teste do nado forçado (TNF)</i>	<i>31</i>
4.4.2. <i>Teste da suspensão da cauda (TSC)</i>	<i>32</i>
4.4.3. <i>Atividade locomotora na caixa de lomoç</i>	<i>32</i>
4.4.4. <i>Modelo de depressão induzida por estresse imprevisível em camundongos</i>	<i>33</i>
4.4.5. <i>Modelo de depressão induzida por homocisteína.....</i>	<i>34</i>
4.4.6. <i>Comportamento de auto-limpeza (“splash test”).....</i>	<i>34</i>
4.4.7. <i>Modelo de mania induzida por ouabaina em ratos</i>	<i>34</i>
4.4.8. <i>Atividade locomotora no campo aberto.....</i>	<i>35</i>
4.5. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS ANIMAIS DO MODELO DE MANIA	35
4.5.1. <i>Preparação de extrato dos tecidos</i>	<i>35</i>
4.5.2. <i>Mensuração dos níveis de glutatona total (GSH-t)</i>	<i>36</i>
4.5.3. <i>Avaliação da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx)</i>	<i>37</i>
4.5.4. <i>Avaliação da atividade da enzima glutatona redutase (GR).....</i>	<i>38</i>

4.5.5. Mensuração dos níveis de TBARS	38
4.5.6. Dosagem de proteínas	39
4.6. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	39
4.6.1. Curva dose resposta do tratamento agudo com ácido fólico e ácido folínico	40
4.6.2. Curva dose resposta do tratamento crônico com ácido fólico	40
4.6.3. Efeitos do ácido fólico no modelo de estresse imprevisível durante 14 dias	41
4.6.4. Estudo do mecanismo de ação do ácido fólico na depressão	41
4.6.5. Envolvimento do sistema serotoninérgico e noradrenérgico	42
4.6.6. Envolvimento dos receptores NMDA na ação antidepressiva do ácido fólico	43
4.6.7. Envolvimento da via L-arginina NO na ação antidepressiva do ácido fólico	44
4.6.8. Envolvimento do sistema opióide na ação antidepressiva do ácido fólico	45
4.6.9. Envolvimento das cascatas de sinalização celular na ação antidepressiva do ácido fólico	46
4.6.10. Investigação do efeito do ácido fólico nas alterações comportamentais e bioquímicas ocasionadas pelo modelo de mania induzido por ouabaina em ratos	46
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS	48
5.1. EFEITOS DO ÁCIDO FÓLICO EM MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO	48
5.1.1. Efeitos do tratamento por via oral com ácido fólico no TNF, TSC e na atividade locomotora em camundongos	48
5.1.2. Efeitos do tratamento agudo por via i.c.v. com ácido fólico e com ácido folínico no TNF e na atividade locomotora em camundongos	49
5.1.3. Efeitos do ácido fólico nos modelos animais de depressão induzida por estresse imprevisível (EI)	51
5.2. INVESTIGAÇÃO DOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSORES E VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDOS NA AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO ÁCIDO FÓLICO NO TNF	53
5.2.1. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF em camundongos	53
5.2.2. Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do ácido fólico no TNF em camundongos	56
5.2.3. Envolvimento dos receptores NMDA e da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF	57
5.2.4. Envolvimento do sistema opióide na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF	61
5.2.5. ENVOLVIMENTO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NA AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO ÁCIDO FÓLICO	64
5.3. EFEITOS DO ÁCIDO FÓLICO EM UM MODELO DE MANIA INDUZIDO POR OUABAÍNA EM RATOS	67
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÕES	91
8. PERSPECTIVAS	93
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Protocolo do estresse imprevisível.....	33
Figura 1. Ativação de NOS neuronal no SNC.....	7
Figura 2. Ativação do eixo HPA em situações de estresse.....	9
Figura 3. Cascata de sinalização do CREB.....	12
Figura 4. A bomba Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	16
Figura 5. Esquema das reações e respectivas enzimas envolvidas na modulação de espécies reativas de oxigênio.....	17
Figura 6. Estrutura química do ácido fólico	20
Figura 7. Transporte de folato através de seus receptores para o SNC.	22
Figura 8. A relação entre o metabolismo do folato e o ciclo de metilação	23
Figura 9. Esquema do protocolo usado na curva dose-resposta do tratamento com ácido fólico.....	39
Figura 10. Esquema do protocolo utilizado para estudar o mecanismo de ação do ácido fólico no TNF.....	42
Figura 11. Esquema do protocolo utilizado para estudar os efeitos do ácido fólico no modelo de mania induzido por ouabaína.	46
Figura 12. Efeito da administração aguda do ácido fólico por via oral no TNF, no TSC e na atividade locomotora.....	48
Figura 13. Efeito da administração durante 30 dias do ácido fólico por via oral no TNF e na atividade locomotora	49
Figura 14. Efeito da administração aguda do ácido fólico por via i.c.v. no TNF, no TSC e na atividade locomotora	50
Figura 15. Efeito da administração aguda do ácido fólico por via i.c.v. no TNF e na atividade locomotora	51
Figura 16. Efeito da administração de ácido fólico ou fluoxetina no TSC em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido por EI.	52
Figura 17. Efeitos do tratamento com homocisteína durante 30 dias no “splash test” e no TSC	53
Figura 18. Efeito do pré-tratamento com um inibidor da síntese de serotonina, PCPA na redução do tempo de imobilidade do ácido fólico e fluoxetina no TNF	54
Figura 19. A) Inibição do efeito anti-imobilidade do ácido fólico no TNF pelo pré-tratamento com WAY100635. B) Influência do pré-tratamento dos camundongos com WAY100635 no efeito de uma dose sub-ativa do ácido fólico no TNF.....	55
Figura 20. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com cetanserina na redução do tempo de imobilidade ocasionado pelo tratamento com ácido fólico no TNF.....	56

Figura 21. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com prazosin ou com ioimbina na redução do tempo de imobilidade ocasionado pelo tratamento com ácido fólico no TNF.	57
Figura 22. A) Efeito do pré-tratamento dos camundongos com NMDA no efeito antidepressivo do ácido fólico. B) Efeito do pré-tratamento dos animais com MK-801 no efeito de uma dose sub-ativa de ácido fólico no TNF.....	58
Figura 23. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com L-arginina ou SNAP no efeito anti-imobilidade do ácido fólico no TNF.	58
Figura 24. Efeito do pré-tratamento com 7-nitroindazol em potencializar o efeito tipo-antidepressivo do ácido fólico no TNF sem causar nenhuma alteração na atividade locomotora no campo aberto	59
Figura 25. Efeito do pré-tratamento com azul de metileno no efeito do ácido fólico no TNF sem causar alteração locomotora em animais testados no campo aberto	60
Figura 26. Efeito do pré-tratamento dos animais com sildenafil	60
Figura 27. Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona ou naloxona metiodida no efeito anti-imobilidade do ácido fólico no TNF.....	61
Figura 28. Efeito da morfina em potencializar a ação de uma dose sub-ativa de ácido fólico no TNF sem causar nenhuma alteração locomotora no campo aberto.....	62
Figura 29. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com naltrindol ou naloxonazina no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF.....	63
Figura 30. Efeitos da naloxona na reversão do efeito antidepressivo sinérgico do MK-801 com ácido fólico no TNF sem causar alteração locomotora no campo aberto	64
Figura 31. Efeito do pré-tratamento de camundongos com H-89 sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido fólico no TNF.	65
Figura 32. Efeito do pré-tratamento de camundongos com PD98059 sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido fólico no TNF.	65
Figura 33. Efeito do pré-tratamento de camundongos com KN-62 no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF.....	66
Figura 34. Efeito do pré-tratamento de camundongos com queleritrina no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF.....	67
Figura 35. Efeito do pré-tratamento dos ratos com ácido fólico, LiCl ou água, duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos, no efeito hiperlocomotor ocasionado pela ouabaína.....	68
Figura 36. Efeito do pré-tratamento dos ratos com ácido fólico, LiCl ou água, duas vezes por dia durante 7 dias consecutivos, no aumento nos níveis de TBARS em córtex cerebral e em hipocampo.....	69
Figura 37. Atividade da enzima GPx em córtex cerebral e em hipocampo de ratos pré-tratados com ácido fólico, LiCl ou água, duas vezes ao dia por 7 dias consecutivos, e tratados agudamente com ouabaína.....	70
Figura 38. Atividade da enzima GR em córtex cerebral e em hipocampo de ratos pré-tratados com ácido fólico, LiCl ou água, duas vezes ao dia por 7 dias consecutivos, e tratados agudamente com ouabaína	71

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HIAA = ácido 5-hidróxi indol acético
- 5-HT = serotonina
- 5-HT_(...) = subtipos de receptores serotoninérgicos
- 5,10-MTHF = 5,10-metileno-tetrahidrofolato
- ACTH = hormônio adrenocorticotrófico
- AMPA = ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
- AMPC = adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- Bcl-2 = proteína anti-apoptótica
- BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro
- CaMKII = proteína cinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina
- CBS = cistationina β- sintetase
- CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais
- CREB = proteína de ligação responsiva ao AMPC
- CRF = fator liberador de corticotrofina
- DA = dopamina
- DHF = dihidrofolato
- DSM-IV = Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais
- EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
- EI = estresse imprevisível
- E.P.M. = Erro Padrão da Média
- ERK = proteínas cinases reguladas por sinal extracelular
- GCs= guanilato ciclase solúvel
- GMP = guanosina 5'monofosfato

GMPc= guanosina 3',5'-monofosfato cíclico

GPx= enzima glutatona peroxidase

GR = enzima glutatona redutase

GSH =glutatona

GSH-t = glutatona total

GSSG =glutatona na forma oxidada

GTP = guanosina 5'-trifosfato

HEPES = ácido n-2-hidoxietilpiperazina

HPA = eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

HVA= ácido homovanílico

i.c.v. = intracerebroventricular

iMAO = inibidores da enzima monoamina oxidase

i.p. = intraperitoneal

ISRS = inibidor seletivo da recaptção de serotonina

LiCl = cloreto de lítio

L-NNA = NG-nitro-L-arginina

MAO = monoamina oxidase

MAPK = proteína cinase ativada por mitógenos

MDA = malonildialdeído

MS = metionina sintetase

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NMDA = N-metil-D-aspartato

nmol = nanomol

NO = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintase

nNOS = óxido nítrico síntase neuronal

NPY = neuropeptídeo Y

PABA = ácido p-aminobenzóico

PCPA = p-clorofenilalanina

PKA = proteína cinase dependente de AMPc

PKC = proteína cinase C

p.o. = via oral

SAH = S-adenosil homocisteína

SAMe = S-adenosil-metionina

SNAP = S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SNC = sistema nervoso central

TB = transtorno bipolar

TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico

THF = tetraidrofolato

TNF = teste do nado forçado

TSC = teste da suspensão da cauda

RESUMO

O ácido fólico (AF) é uma vitamina do complexo B que segundo estudos clínicos pode estar envolvido na fisiopatologia dos transtornos de humor. Neste trabalho foi investigado o efeito desta vitamina em modelos animais de depressão e de mania para a melhor compreensão dos mecanismos de regulação desses estados de humor contribuindo, desta forma, para o futuro desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para controle e/ou remissão dos sintomas associados a estes transtornos. A administração aguda de AF por via oral (p.o.) produziu um efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) nas doses de 50 e 100 mg/kg e no teste da suspensão da cauda (TSC) nas doses de 10 e 50 mg/kg. A administração p.o. de AF nas doses de 50 e 100 mg/kg por 30 dias diminuiu significativamente o tempo de imobilidade no TNF. O AF também apresentou efeito antidepressivo quando administrado por via intracerebroventricular (i.c.v.) na dose de 10 nmol/sítio no TNF e nas doses de 1 e 10 nmol/sítio no TSC. O tratamento com o ácido folínico (10 nmol/sítio, i.c.v.), um metabólico ativo do AF, também produziu um efeito antidepressivo no TNF. A redução do tempo de imobilidade ocasionada pelo AF e ácido folínico no TNF e no TSC não pode ser atribuída a um efeito psicoestimulante destes compostos, pois os tratamentos com os mesmos não alteraram a locomoção dos camundongos em uma caixa de locomoção após prévia habituação dos mesmos por 2 h à caixa. Neste estudo também foi verificado que o AF (10 e 100 mg/kg, p.o., 7 dias) foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo no TSC induzido pelo modelo de estresse imprevisível e que a administração de homocisteína (200 mg/kg, p.o, 30 dias) causou comportamento tipo-depressivo no splash teste e no TSC. Na avaliação dos sistemas de neurotransmissores e nas vias de sinalização celular envolvidos no mecanismo de ação antidepressiva do ácido fólico, foi demonstrado que o seu efeito antidepressivo no TNF foi prevenido pelo pré-tratamentos dos camundongos com PCPA (100 mg/kg, i.p., 4 dias consecutivos), WAY100635 (0,1 mg/kg,s.c.), cetanserina (5 mg/kg, i.p.), prazosin (1 mg/kg, i.p.), ioimbina (1 mg/kg, i.p.), NMDA (0,1 pmol/sítio), L-arginina (750 mg/kg, i.p.), SNAP (25 µg/sítio, i.c.v.), sildenafil (5 mg/kg,i.p.), naloxona (1 mg/kg, i.p.), naltrindol (3 mg/kg, i.p.), naloxonazina (10 mg/kg, i.p), H-89 (1 µg/sítio, i.c.v.) e KN-62 (1 µg/sítio, i.c.v.). O tratamento com uma dose sub-ativa de AF p.o e/ou i.c.v. produziu um efeito sinérgico com fluoxetina (10 mg/kg, p.o.), WAY100635 (0,1 mg/kg,s.c.), 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p.), azul de metileno (20 mg/kg, i.p.) e morfina (1 mg/kg, s.c.). Em outra etapa do nosso estudo, o objetivo foi verificar o efeito do AF em um modelo animal de mania. Para este fim, a ouabaína, um inibidor da bomba Na^+K^+ -ATPase, foi administrada em ratos (50 pmol/sítio, i.c.v.), causando um aumento significativo na atividade locomotora no campo aberto. Este efeito foi prevenido pelo pré-tratamento p.o. duas vezes ao dia por 7 dias com AF (50 e 100 mg/kg) ou LiCl (controle positivo; 45 mg/kg). Além disso, a administração de ouabaína produziu redução da atividade da glutathione peroxidase em hipocampo e da glutathione redutase em córtex cerebral e hipocampo e aumento nos níveis de TBARS nas duas estruturas. O pré-tratamento dos animais com AF (10-100 mg/kg, p.o.) ou LiCl preveniu estas alterações. O conjunto dos resultados permite concluir que o AF possui atividade antidepressiva pela interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, glutamatérgico, opioidérgico, via L-arginina-NO-GMPc e com as vias de sinalização celular (PKA e CaMKII) e antimaníaca possivelmente por prevenir a inibição da bomba de Na^+K^+ -ATPase e por possuir propriedades antioxidantes.

Palavras chave: ácido fólico, depressão, mania, serotonina, noradrenalina, óxido nítrico, NMDA, opióides, PKA, CaMKII, estresse oxidativo

ABSTRACT

Clinical studies have indicated that folic acid (FA), a water-soluble vitamin of the B complex, may be involved in the pathophysiology of mood disorders. In this study, the effects of this vitamin in animal models of depression and mania were investigated, in order to better understand the mechanisms underlying the regulation of these mood disorders. It may also contribute to the further development of new therapeutical strategies for the control and/or remission of the symptoms associated with these mood disorders. The acute administration of FA by oral (p.o.) route produced an antidepressant-like effect in the forced swimming test (FST) (dose range 50-100 mg/kg) and in the tail suspension test (TST) at the doses of 10 and 50 mg/kg. The administration of FA at the doses of 50 and 100 mg/kg, p.o. for 30 days significantly reduced the immobility time in the FST. FA administered by intracerebroventricular (i.c.v.) route also produced an antidepressant-like effect in the FST (10 nmol/site) and in the TST (1-10 nmol/site, i.c.v.). The treatment with folinic acid (10 nmol/site, i.c.v.), an active metabolite of FA, also produced an antidepressant-like effect in the FST. The reduction in the immobility time induced by FA and folinic acid in the FST and TST was not due to a psychostimulant effect, since the treatments with these agents did not alter the locomotion in mice previously habituated to the novel environment for 2 h. In this study, FA (10 and 100 mg/kg, p.o., 7 days) was also able to reverse the depressant-like behavior in the TST induced by a model of unpredictable stress. In addition, the administration of homocysteine (200 mg/kg, p.o., 30 days) elicited a depressant-like behavior in the splash test and in the TST. In the experiments designed to investigate the neurotransmitter system and signaling pathways involved in the antidepressant effects of FA, it was demonstrated that its antidepressant-like effect was prevented by the pretreatment of mice with PCPA (100 mg/kg, i.p., 4 consecutive days), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.), ketanserin (5 mg/kg, i.p.), prazosin (1 mg/kg, i.p.), yohimbine (1 mg/kg, i.p.), NMDA (0.1 pmol/site), L-arginine (750 mg/kg, i.p.), SNAP (25 µg/site, i.c.v.), sildenafil (5 mg/kg, i.p.), naloxone (1 mg/kg, i.p.), naltrindole (3 mg/kg, i.p.), naloxonazine (10 mg/kg, i.p.), H-89 (1 µg/site, i.c.v.) and KN-62 (1 µg/site, i.c.v.). The treatment with a sub-effective dose of FA by p.o. and/or i.c.v. route produced a synergistic antidepressant-like effect with fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.), 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p.), methylene blue (20 mg/kg, i.p.) and morphine (1 mg/kg, s.c.). In another phase of the study, the effect of FA in an animal model of mania was investigated. To this end, ouabain, a Na⁺K⁺-ATPase inhibitor was administered to rats (50 pmol/site, i.c.v.). It caused a significant increase in the locomotor activity in the open-field test. This effect was prevented by the pretreatment of rats by p.o. route, twice daily for 7 days with FA (50 and 100 mg/kg) or LiCl (positive control; 45 mg/kg). Moreover, the administration of ouabain produced a reduction in the activity of glutathione peroxidase in hippocampus and glutathione reductase in cerebral cortex and hippocampus as well as an increase in TBARS levels in both structures. The pretreatment of rats with FA (10-100 mg/kg, p.o.) or LiCl prevented these alterations. Together the results allow us to conclude that FA has an antidepressant-like effect by interacting with the serotonergic, noradrenergic, glutamatergic, opioid systems, L-arginine-NO-GMPc pathway and the signaling pathways (PKA e CaMKII). Moreover, it has an antimanic action likely dependent on the reversal of the Na⁺K⁺-ATPase inhibition and due to its antioxidant property.

Key words: folic acid, depression, mania, serotonin, noradrenaline, nitric oxide, NMDA, opioids, PKA, CaMKII, oxidative stress

1. Introdução

A depressão e descrições do que agora chamamos de transtornos do humor podem ser encontrados em muitos textos antigos. A história do Rei Saul, no Antigo Testamento, descreve uma síndrome depressiva, assim como a história do suicídio de Ajax, na *Ilíada* de Homero. Cerca de 400 anos antes de Cristo, Hipócrates usou os termos "mania" e "melancolia" para perturbações mentais (Alcântara et al., 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os transtornos do humor, englobando depressão maior ou unipolar e transtorno bipolar (TB) representam graves problemas de saúde pública. A depressão foi estimada como a quarta causa específica de incapacitação na década de 90 através de uma escala global para comparação de várias doenças. A previsão para o ano 2020 é a de que será a segunda causa de incapacitação em países desenvolvidos e a primeira em países em desenvolvimento (Murray e Lopez, 1997). Quando comparada às principais condições médicas crônicas, a depressão só tem equivalência em incapacitação às doenças isquêmicas cardíacas graves (Wells et al., 1989).

Os custos do TB, considerando apenas a forma mais grave, que acomete entre 1% e 2 % da população geral, foram calculados entre 12 mil e 18 mil dólares ao ano por paciente. Desses, 80% representam custos indiretos e somente 20% estão relacionados ao tratamento (para revisão ver Dardennes et al., 2006).

Apesar de novas descobertas e avanços no estudo das bases neurobiológicas e abordagens terapêuticas no transtorno bipolar e depressão, elevadas taxas de recorrência, sintomas subsindrômicos persistentes e refratariedade terapêutica são aspectos clínicos desafiadores nestas doenças (Machado-Vieira e Soares, 2007).

Sendo assim, a busca por substâncias capazes de induzirem uma rápida e sustentável melhora do quadro clínico destes transtornos e que apresentem poucos efeitos colaterais se faz necessária.

1.1. Depressão maior ou unipolar

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, inclui sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos. Esta doença causa uma considerável morbidade psiquiátrica, perda da produtividade, além de ser o principal fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas e isquemia cerebral e estar associada com risco de suicídio (para revisão ver Nemeroff e Owens, 2002). Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas terão algum tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (Nardi, 2000).

O diagnóstico do transtorno depressivo maior é baseado em critérios estabelecidos pelo Manual Estatístico e Diagnóstico de Doenças Mentais, 4ª edição da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV). Um conjunto de sintomas caracteriza clinicamente a depressão: 1. humor deprimido a maior parte do tempo; 2. diminuição marcante no interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades (anedonia); 3. aumento ou diminuição significativa de peso ou apetite; 4. insônia ou hiperinsônia; 5. agitação ou retardo psicomotor; 6. fadiga ou falta de energia; 7. sentimentos de culpa ou desvalia excessivos; 8. diminuição na capacidade de concentração e pensamento; 9. pensamentos recorrentes de morte, idéias ou tentativas de suicídio, sentimentos de desesperança. O indivíduo para preencher os critérios de depressão maior deve apresentar pelo menos um entre os dois primeiros sintomas e mais o número necessário para perfazer um total de cinco entre os sintomas três a nove, com duração mínima de duas semanas (American Psychiatry Association, 1994).

Além dos sintomas acima enumerados, o indivíduo com depressão apresenta um grande número de co-morbidades com doenças clínicas como as cardiovasculares, cérebro-vasculares

e metabólicas (Teng et al., 2005) e também com outras doenças psiquiátricas (para revisão ver Nemeroff e Owens, 2002).

1.1.1. Sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização celular envolvidos na fisiopatologia da depressão

Os mecanismos envolvidos na patogênese da depressão ainda não são totalmente compreendidos. A depressão pode resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos. A hipótese monoaminérgica postula que a depressão resulta de uma deficiência de serotonina (5-HT) ou noradrenalina (NA), ou ainda de receptores deficientes para estes neurotransmissores (para revisão ver Schildkraut, 1965; Mann et al., 1995). Esta hipótese é evidenciada por vários fatores, tais como: 1) vários antidepressivos aumentam a concentração de 5-HT ou NA na fenda sináptica, pois bloqueiam a recaptação destes neurotransmissores (para revisão ver Richelson, 1999); 2) têm sido observados baixos níveis plasmáticos de 5-HT em pacientes com depressão maior (para revisão ver Coppen e Doogan, 1988); 3) o nível reduzido de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da 5-HT, no líquor de pacientes depressivos (para revisão ver Ricci e Wellman, 1990) e, por último, 4) a reserpina, uma droga que depleta catecolaminas, pode causar sintomas de depressão (para revisão ver Wong e Licinio, 2001). No entanto, esta hipótese falha ao não explicar a falta de correlação temporal entre os eventos bioquímicos rápidos que aumentam as monoaminas na fenda sináptica e o início tardio dos efeitos clínicos do tratamento com antidepressivos. Além disso, nem toda droga que aumenta as monoaminas na fenda sináptica atua como antidepressiva (como por exemplo, a anfetamina) (Baldessarini, 1996).

Apesar de os antidepressivos usados na atualidade exercerem seu mecanismo de ação envolvendo o aumento de monoaminas na fenda sináptica, há vários estudos pré-clínicos que

evidenciam a participação de outros sistemas de neurotransmissores na fisiopatologia da depressão, tais como o sistema glutamatérgico, principalmente via receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (para revisão ver: Skolnick, 1999, 2002; Petrie et al., 2000), a via da L-arginina-óxido nítrico (NO) (Harkin et al., 1999, 2003) e o sistema opióide (Gabilondo et al., 1995). Além disso, a depressão pode ser desencadeada por alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (para revisão ver Manji et al., 2001; Gould et al., 2004; Pittenger e Duman, 2008), pelo aumento no estresse oxidativo (Bilici et al., 2001; Forlenza e Miller, 2006), pela liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas com a ativação do sistema imunológico (Dunn et al., 2005) e pelo aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides e desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Perera et al., 2007; Pittenger e Duman, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que o sistema glutamatérgico pode estar envolvido na fisiopatologia dos transtornos de humor, sendo um alvo para a ação de compostos antidepressivos (para revisão ver Zarate et al., 2003). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e é encontrado em aproximadamente 80% dos neurônios (para revisão ver Kornhuber e Weller, 1997). Devido ao papel do glutamato na plasticidade neuronal, a modulação do sistema glutamatérgico tem sido investigada em estudos sobre transtornos de humor que apresentam diminuição do humor, concentração, atenção e memória (Zarate et al., 2002; para revisão ver Kew e Kemp, 2005).

As ações do glutamato são mediadas pela estimulação de seus receptores que são classificados em: ionotrópicos, que formam canais iônicos e metabotrópicos, ligados a proteínas G. Os receptores ionotrópicos possuem propriedades farmacológicas e fisiológicas que os subdividem em três populações distintas: os ativados por NMDA, os que respondem ao cainato e os sensíveis ao ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

(AMPA). Estes receptores quando estimulados abrem o poro do canal para o influxo de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Aos receptores AMPA e kainato é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons Na^+ e K^+ . Os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias e são altamente permeáveis ao Ca^{2+} . Este influxo de íons muda a polarização da superfície neuronal e ativa as vias de sinalização intracelulares. Os receptores metabotrópicos exercem suas ações através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (para revisão ver Palmada e Centelles, 1998).

A ativação dos receptores NMDA tem sido relacionada aos mecanismos de plasticidade neuronal, processos de aprendizagem e memória e desenvolvimento neuronal (para revisão ver: Dingledine et al., 1999; Petrie et al., 2000). Contudo, a ativação excessiva destes receptores tem sido associada à neurotoxicidade presente em muitas doenças neuropsiquiátricas e neurológicas (para revisão ver Kornhuber e Weller, 1997). Alguns estudos têm demonstrado que antagonistas de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA apresentam propriedades antidepressivas e produzem alterações neuroquímicas e comportamentais similares a drogas antidepressivas em modelos animais de depressão e que o tratamento com antidepressivos diminui a expressão das subunidades deste receptor (para revisão ver: Skolnick, 1999, 2002; Petrie et al., 2000). Além disso, um estudo demonstrou que pacientes que receberam tratamento com ketamina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA, apresentaram uma redução significativa no escore da escala Hamilton de depressão (um maior escore indica maior severidade da doença) em relação aos pacientes deprimidos que receberam placebo (Berman et al., 2000).

Os receptores NMDA quando ativados ocasionam um influxo de cálcio, ativando a enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte a L-arginina em óxido nítrico (NO) (ver

Figura 1) (para revisão ver: Moncada et al., 1989; Esplugues, 2002; Bishop e Anderson, 2005). O NO é uma molécula sinalizadora em vários tecidos e células, e no SNC desempenha um papel relevante na sinalização neuronal, plasticidade sináptica, aprendizado, percepção da dor, agressividade, ansiedade (para revisão ver: Snyder, 1992; Esplugues, 2002) e depressão (Harkin et al., 1999). O NO tem múltiplos alvos, dentre eles, ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte a guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Moncada, 1994).

Estudos têm demonstrado que os inibidores da NOS exercem efeitos antidepressivos em modelos animais de depressão (Harkin et al., 1999, 2003; Yildiz et al., 2000; Da Silva et al., 2000; Volke et al., 2003). Além disso, o tratamento com inibidores da NOS aumenta a liberação de 5-HT no córtex frontal de ratos (Smith e Whitton, 2000) e a 5-HT endógena parece ser importante para o efeito antidepressivo de inibidores da NOS, como o 7-nitroindazol (Harkin et al., 2003). Também foi demonstrado em estudos *in vitro* que o tratamento com antidepressivos como citalopram, paroxetina e imipramina diminui a atividade da NOS no hipocampo (Wegener et al., 2003).

Confirmando a hipótese que a inibição da NOS, com subsequente diminuição de GMPc pode produzir efeitos antidepressivos alguns estudos tem demonstrado que o tratamento com azul de metileno que é um inibidor da NOS e da GCs ou com o ODQ que é um inibidor específico da GCs diminuem o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Eroglu e Caglayan, 1997; Heiberg et al., 2002; Kaster et al., 2005; Ergün e Ergün, 2007).

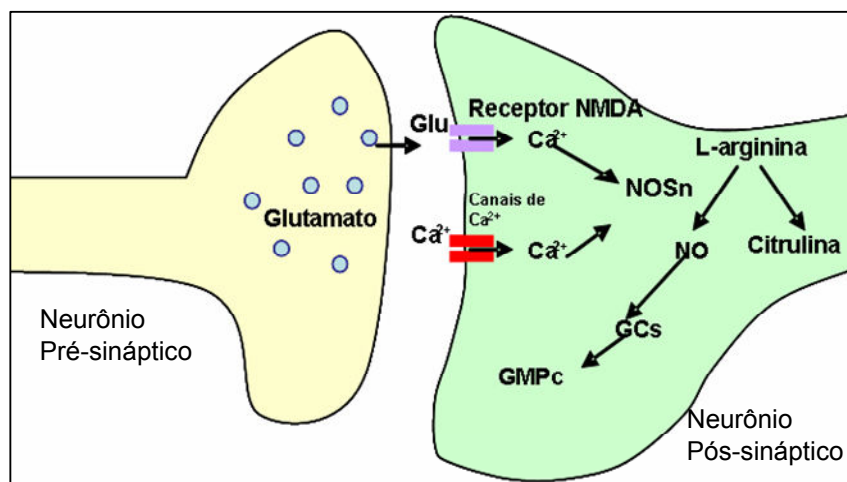


Figura 1. Ativação de NOS neuronal (nNOS) no SNC. A liberação de glutamato ativa os receptores NMDA, ocasionando influxo de cálcio, o qual ativa a NOS que converte L-arginina em NO (adaptado de Esplugues, 2002).

Outro sistema que tem sido proposto como um novo alvo para o tratamento da depressão é o sistema opióide. Os opióides são conhecidos por alterar o humor; por exemplo, a ativação do receptor μ -opióide produz euforia, enquanto a retirada de opióide após um período prolongado de uso pode induzir sintomas semelhantes à depressão. Estudos clínicos demonstraram que a concentração do peptídeo opióide β -endorfina está diminuída em pacientes deprimidos e que estes níveis retornam ao normal após o tratamento com fluvoxamina (Djurovic et al., 1999) e ainda, que a administração de β -endorfina possui propriedades antidepressivas (Kline et al., 1977, Catlin et al., 1980). De forma semelhante, foi sugerido que alguns ligantes de opióides, como a ciclazocina, buprenorfina, oxicodona e oximorfona tenham propriedades antidepressivas em pacientes com depressão refratária ou resistente ao tratamento (Bodkin et al., 1995; Stoll e Rueter, 1999). Além disso, antidepressivos típicos podem produzir efeitos antinociceptivos e antidepressivos por modulação, liberação dos opióides endógenos ou através de mudanças na expressão destes receptores (Djurovic, et al., 1999; para revisão ver Sawynok et al., 2001; Vilpoux et al.,

2002). Desta forma, o efeito terapêutico de alguns antidepressivos, principalmente na depressão severa, poderia estar relacionado com a modulação do sistema opióide (Schreiber et al., 2002).

Outro fator de relevada importância na fisiopatologia da depressão unipolar é o estresse, o qual parece ser um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo à depressão. Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial (para revisão ver Post, 1992). O eixo HPA é um grande elemento do sistema do estresse e tanto o estresse agudo quanto o crônico pode ocasionar a depressão maior (Kendler et al., 2003). A atividade do eixo HPA é governada pela secreção de corticotrofina (CRF) e vasopressina pelo hipotálamo, os quais, por sua vez, ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária, que finalmente estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal (para revisão ver Nemeroff, 1996). Os glicocorticóides interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição negativa da secreção do ACTH pela pituitária e do CRF a partir do hipotálamo (ver Figura 2). No entanto, em grande parte dos pacientes deprimidos, o controle inibitório da atividade do eixo HPA parece estar comprometido, uma vez que estes podem apresentar níveis basais elevados de cortisol no plasma, na urina e no fluido cerebrospinal; resposta exagerada de cortisol após estimulação com ACTH; aumento tanto da pituitária como das glândulas adrenais e falta de resposta ao teste de supressão com o corticosteróide sintético dexametasona (Baungartner et al., 1985; Gold et al., 1996; para revisão ver: Holsboer e Barden, 1996; Nemeroff, 1996). Além disso, alguns estudos pré-clínicos têm mostrado que a prolongada superprodução de glicocorticóides danifica as estruturas cerebrais (especialmente o hipocampo) essenciais para o controle do eixo HPA (Sapolsky, 1986).

O envolvimento do eixo HPA na neurobiologia da depressão é apoiado, ainda, pela observação de que indivíduos com síndrome de Cushing apresentam déficits cognitivos e alterações na estrutura e função hipocampais, semelhantes àquelas encontradas em pacientes deprimidos (Starkman et al., 1992).

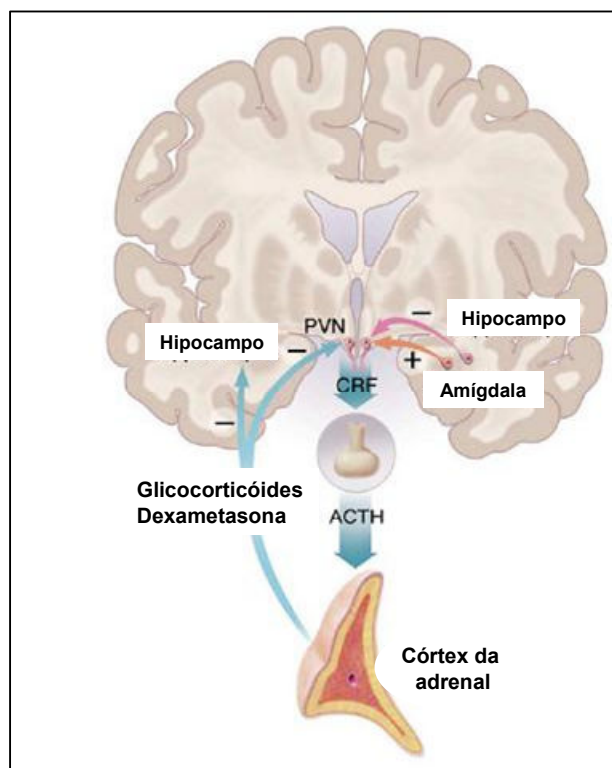


Figura 2. Ativação do eixo HPA em situações de estresse. Os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo recebem aferências excitatórias da amígdala e inibitórias do hipocampo para a secreção de CRF. O CRF libera a secreção de ACTH pela hipófise que estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal. Os glicocorticóides (incluindo a forma sintética como a dexametasona) reprimem a síntese e a liberação do CRF e do ACTH. Altos níveis de glicocorticóides causam dano hipocampal o que pode iniciar e manter os níveis de cortisol aumentados em alguns casos de depressão (adaptado de Nestler et al., 2002a).

Sapolsky e colaboradores (2000) propuseram um mecanismo onde o estresse e conseqüentemente altos níveis de glicocorticóides apresentam como resultado excitotoxicidade glutamatérgica, distúrbio da homeostase do cálcio, inibição do transporte de glicose e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, em casos extremos o estresse induz, através de vias de sinalização, a atrofia e a morte celular e

compromete neurônios hipocâmpais em sua habilidade de responder a outros insultos (para revisão ver McEwen, 1999). A ação de compostos antidepressivos nestes processos sugere que estes fármacos atuem sobre vias de sinalização que revertem ou bloqueiam os efeitos deletérios do estresse na morfologia e sobrevivência celular (para revisão ver: Vaidya e Duman, 2001; Gould e Manji, 2002; Coyle e Duman, 2003; Nair e Vaidya, 2003; Castrén et al., 2007).

Além disso, vários estudos têm mostrado que o tratamento crônico com antidepressivos regula vários fatores envolvidos nas vias de sobrevivência celular, dentre eles, proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína anti-apoptótica Bcl2 e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (para revisão ver: Manji et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002; Taylor et al., 2005; Blendy, 2006). Vários trabalhos mostraram também que os antidepressivos ativam as vias proteína cinase dependente de AMPc (PKA), da proteína cinase C (PKC) e modulam as vias da proteína cinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) e das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e das proteínas cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) (ver Figura 3) (para revisão ver: Popoli et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002; Malberg e Blendy, 2005; Taylor et al., 2005). Essas proteínas cinases fosforilam o CREB, o qual aumenta a expressão de genes como o BDNF (para revisão ver: Duman et al., 1997; 1999; Hashimoto et al., 2004, Nair e Vaidya, 2006; Castrén et al., 2007).

A PKA é uma holoenzima tetramérica que está funcionalmente envolvida na síntese e liberação de neurotransmissores, expressão de genes, atividade de canais iônicos, plasticidade sináptica, memória, diferenciação e sobrevivência celulares (Duman, 2002; para revisão ver Gould e Manji, 2002). Alguns estudos clínicos têm demonstrado uma significativa diminuição da atividade da PKA em fibroblastos de indivíduos com depressão maior (Shelton et al., 1996, 1999; Manier et al., 2000).

A via MAPK/ERK regula vários processos celulares como a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular e também pode fosforilar o CREB (para revisão ver Schaeffer e Weber, 1999). Portanto, a via MAPK/ERK poderia representar um alvo importante para a atividade dos antidepressivos. Mercier e colaboradores (2004) demonstraram que a fluoxetina (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina) ativa rapidamente os genes de proteínas envolvidos na neuroproteção (BDNF e o fator neurotrófico derivado da glia, GDNF) através da via MAPK em culturas de astrócitos. Por outro lado, a administração crônica de fluoxetina em cérebros de ratos causou uma inibição da fosforilação de ERK 1 e 2 (Fumagalli et al., 2005).

A CaMKII é a proteína cinase mais abundante do cérebro (para revisão ver Popoli et al., 2001) e modula vários aspectos das funções neuronais, como a síntese de neurotransmissores, excitose, expressão gênica e interações do citoesqueleto (para revisão ver Du et al., 2004). Vários estudos demonstraram que o tratamento crônico com antidepressivos aumenta a auto-fosforilação e atividade da CaMKII no hipocampo (para revisão ver: Duman et al., 1999; Manji et al., 2001; Popoli et al., 2001,2002), sugerindo que a modulação desta proteína pode ter um efeito relevante no tratamento da depressão.

Outra proteína cinase com um importante papel na transdução de sinais intracelulares é a PKC que faz parte da família de proteínas cinase serina-treonina ativadas por lipídeos e cálcio (para revisão ver: Parker e Murray-Rust, 2004; Poole et al., 2004). Estas proteínas estão envolvidas na fosforilação de diferentes proteínas e apresentam várias funções, como a regulação do crescimento e diferenciação celulares, excitose, expressão gênica, modulação da condutância iônica e proliferação celular (para revisão ver Kanashiro e Khalil, 1998). A ativação da PKC, de forma similar à PKA, resulta na fosforilação do CREB (Hoeffler et al., 1989). Alguns estudos sugerem que a PKC esteja associada à fisiopatologia de comportamentos suicidas, uma vez que a atividade catalítica e a expressão desta proteína está

diminuída em cérebros de pacientes depressivos que cometeram suicídio (Pandey et al., 2004), assim como há uma diminuição no estado de fosforilação em fração de membrana de córtex pré-frontal da cinase C miristoilada rica em alanina (MARCKS), a qual é um substrato da PKC (Pandey et al., 2003) .

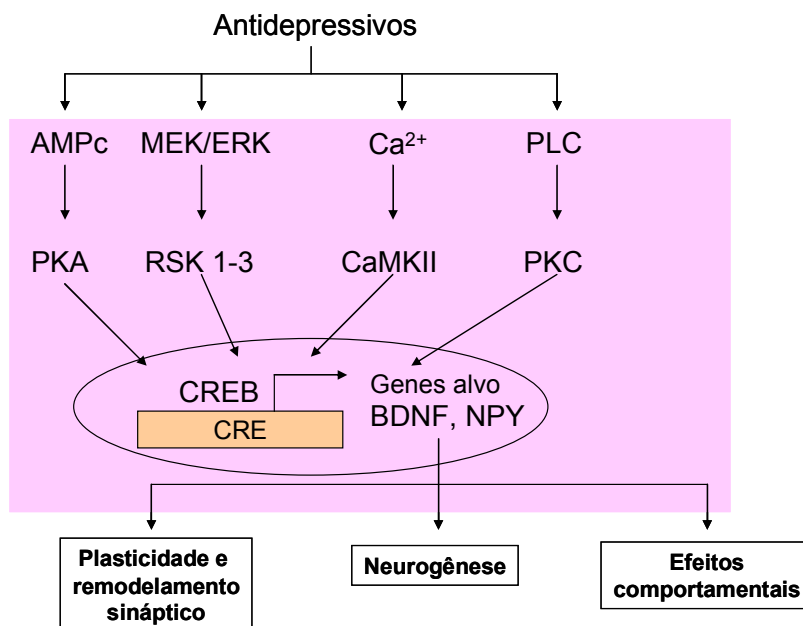


Figura 3. Cascata de sinalização do CREB. O CREB é regulado por diversas vias de sinalização e pode servir como o integrador central da ação de diversos estímulos externos, incluindo os antidepressivos. Estes recrutam algumas vias de transdução de sinais, incluindo a AMPc- proteína cinase A (PKA), via de sinalização MAP cinase (MERK/ERK) como também a via da CaMKII e da proteína cinase C (PKC). Como consequência do aumento da função do CREB há um aumento da expressão de genes-alvos como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do neuropeptídeo Y (NPY) que podem contribuir para as mudanças mediadas por antidepressivos na plasticidade neuronal e no comportamento (adaptado de Nair e Vaidya, 2006).

1.1.2. Tratamento farmacológico da depressão

Para o tratamento da depressão encontram-se no mercado vários fármacos com propriedades antidepressivas: os tricíclicos, os inibidores da enzima monoamina oxidase (iMAO), os inibidores seletivos da recaptação de monoaminas e mais recentemente os

antidepressivos triplos (para revisão ver: Berton e Nestler, 2006; Nemeroff, 2006; Chen e Skolnick, 2007). Os antidepressivos tricíclicos e os iMAO aumentam a concentração de noradrenalina e serotonina no cérebro, através da inibição da recaptação destes neurotransmissores ou por impedir a sua degradação (para revisão ver Brunello et al., 2002). Os inibidores da recaptação de serotonina, como a fluoxetina, são os agentes terapêuticos mais utilizados atualmente no tratamento da depressão (para revisão ver: Frazer, 1997; Nemeroff e Owens, 2002).

Contudo, a resposta aos antidepressivos não é imediata e costuma ocorrer entre a segunda e a quarta semana de uso (Anderson et al., 2000). Além disso, os antidepressivos somente proporcionam uma remissão completa da sintomatologia para cerca de 50% dos indivíduos com depressão maior (Nestler et al., 2002a), além de causarem efeitos colaterais, tais como ganho de peso e sedação (para revisão ver Brunello et al., 2002; Stahl e Grady, 2003).

Desta forma, existe a necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento da depressão.

1.2. Transtorno Bipolar

O TB é um transtorno crônico e complexo caracterizado por episódios de depressão, mania ou hipomania de forma isolada ou mista com grande morbidade e mortalidade. A mania é o mais característico dos episódios e, apesar de freqüente e incapacitante é pouco estudada e diagnosticada (Shastry, 2005). Ela afeta o humor e as funções vegetativas, como sono, cognição, psicomotricidade e nível de energia. Em um episódio maníaco clássico, o humor é expansivo ou eufórico, diminui a necessidade de sono, ocorre aumento da energia, de

atividades prazerosas, da libido, além de inquietação e agitação psicomotora. O pensamento torna-se mais rápido, podendo evoluir para a fuga de idéias. O discurso é caracterizado por prolixidade e pressão para falar. As idéias costumam ser de grandeza, podendo ser delirantes. Geralmente a crítica está prejudicada e os ajuizamentos emitidos se afastam da realidade do paciente (para revisão ver Young et al., 2007).

O diagnóstico de TB de acordo com o DSM-IV requer humor persistente e anormalmente elevado, expansivo ou irritável durando pelo menos uma semana. Caso seja necessária a hospitalização antes de uma semana, o diagnóstico também pode ser feito. Além da alteração de humor, pelo menos três (ou quatro se o humor é irritável) dos seguintes sintomas devem estar presentes: grandiosidade, necessidade diminuída de sono, pressão para falar, fuga de idéias ou pensamentos correndo, distratibilidade, aumento da atividade dirigida a objetivos ou agitação psicomotora, envolvimento excessivo em atividades prazerosas. Em 2001, Akiskal e colaboradores propuseram novos critérios para o diagnóstico de mania. Deram ênfase à ativação psicomotora como central na mania, humor depressivo ou ansioso, além de eufórico ou irritável, ausência de crítica e quatro dos seguintes sintomas: aumento de energia, diminuição da necessidade de ajuda, grandiosidade, sociabilidade excessiva, aumento da libido, fuga de idéias e distratibilidade.

No Brasil o TB acomete cerca de 1% da população geral (Lima et al., 2005). Mesmo sendo pouco freqüente se comparado à depressão maior, seu impacto sobre a vida dos indivíduos e seus grupos de convívio se traduz em um sério problema de saúde pública. Além disso, a gravidade da depressão bipolar e o risco de o paciente bipolar cometer suicídio são altos (para revisão ver Müller-Oerlinghausen et al., 2002).

1.2.1. Sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização envolvidos na fisiopatologia do transtorno bipolar

As hipóteses iniciais sobre a fisiopatologia do TB focaram o sistema monoaminérgico (Young et al., 1994). Prange e colaboradores (1974) formularam a hipótese permissiva, na qual um déficit na neurotransmissão serotoninérgica central permitiria a expressão tanto da fase maníaca, quanto da depressiva; contudo, tais fases difeririam em relação aos níveis de catecolaminas (noradrenalina e dopamina) centrais, que estariam elevadas na mania e diminuídas na depressão. Porém, um estudo *pós-mortem* de cérebros de pacientes com TB constatou níveis significativamente menores do metabólito de 5-HT, 5-HIAA, no córtex frontal e parietal (Young et al., 1994). Além disso, Shiah e Yatham (2000) sugeriram uma função serotoninérgica central diminuída, associada a uma função noradrenérgica aumentada na gênese da mania.

Ainda em relação à fase maníaca do TB, é descrito um aumento nos níveis plasmáticos, urinários e no líquor do ácido homovanílico (HVA), um metabólito da dopamina (Potter et al., 1987). Além disso, as anfetaminas, substâncias capazes de induzir mania, aumentam a liberação de dopamina e os antipsicóticos, que antagonizam os receptores dopaminérgicos, agem como eficazes agentes antimaniacos (Brown et al., 2001).

No entanto, as manifestações comportamentais e fisiológicas do TB são complexas e mediadas por vários sistemas neurais interconectados (Manji et al., 1999). Vários estudos pré-clínicos e clínicos mostram que no TB há também hiperatividade do eixo HPA (Watson et al., 2004, para revisão ver Daban et al., 2005), diminuição da atividade da bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase (El-Mallakh e Wyatt, 1995; para revisão ver Müller-Oerlinghausen et al, 2002; Herman et al., 2007) e alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (Gould et al., 2004; Shaltiel et al., 2007).

A bomba Na^+, K^+ -ATPase (ver Figura 4) que mantém e restabelece o gradiente eletroquímico da célula depois de cada potencial de ação tem sua atividade diminuída na fase maníaca e na fase depressiva do TB (El-Mallakh e Wyatt, 1995). A atividade diminuída desta

bomba acarreta várias alterações celulares que podem ocasionar danos ao SNC, como aumento da excitabilidade neuronal e aumento na duração da liberação de neurotransmissores por diminuir a liberação de Ca^{2+} . Por outro lado, enquanto a redução da atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase pode causar um potencial de repouso com limiar menor, pode também diminuir a amplitude do potencial de ação e reduzir a liberação de neurotransmissores. O restabelecimento neuronal depois do disparo do potencial de ação torna-se prejudicado. Conseqüentemente, uma modesta diminuição da atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase produz um aumento global na excitabilidade dos neurônios, que é proposto ocorrer na fase da mania. Uma redução mais significativa da atividade da bomba pode acentuar a excitabilidade neuronal, reduzir a eficácia sináptica e a velocidade de recuperação do potencial de repouso pelos neurônios. Estas alterações podem produzir déficits: cognitivo e motor acompanhados por irritabilidade, geralmente encontrados no transtorno bipolar (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Hermam et al., 2007).

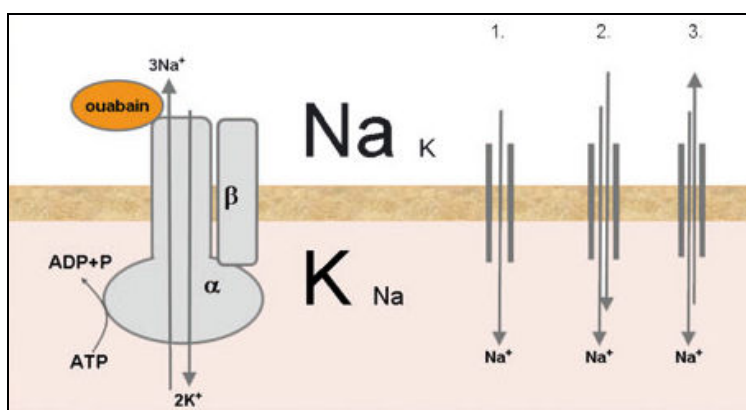


Figura 4. A bomba Na^+ , K^+ -ATPase usa a energia da hidrólise do ATP para transportar Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula. O gradiente criado por este transporte ativo permite que o Na^+ entre na célula via canais de Na^+ (1), por co-transportadores (2), e por trocadores de cálcio/sódio (3). A ouabaína inibe a Na^+ , K^+ -ATPase ao se ligar a subunidade α , do lado extracelular da proteína (retirado de Aperia, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo (ver Figura 5), situação aonde existe um desequilíbrio na geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Sies, 1997), também pode estar associado com a fisiopatologia do TB (Kuloglu et al., 2002; Machado-Vieira et al., 2007; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003; Savas et al., 2006; para revisão ver Ng et al., 2008). Estudos clínicos têm mostrado aumento da peroxidação lipídica, indicado pelo nível aumentado de TBARS no soro de pacientes, e alterações eritrocitárias e plasmáticas nas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, glutathiona peroxidase (GPx) e catalase foram relatadas em indivíduos com TB (Kuloglu et al., 2002; Machado-Vieira et al., 2007; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003; Savas et al., 2006; para revisão ver Ng et al., 2008). Além disso, estudos pré-clínicos têm demonstrado aumento dos marcadores de estresse oxidativo em cortex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por anfetamina (Frey et al., 2006 a,b). Em adição, alguns estudos demonstram que os agentes estabilizadores de humor, lítio e valproato, exercem efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo *in vivo* (Frey et al., 2006 a,b) e *in vitro* (Shao et al., 2006, 2008) e o tratamento com lítio diminui o nível de TBARS no plasma de pacientes com transtorno bipolar (Aliyazicioglu et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007).

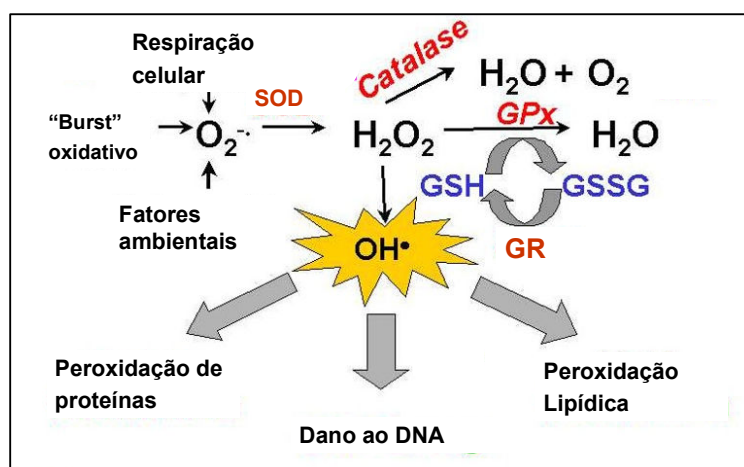


Figura 5. Esquema das reações e respectivas enzimas (em vermelho) envolvidas na modulação de espécies reativas de oxigênio. SOD= superóxido dismutase, GPx= glutathiona peroxidase, GR= glutathiona redutase (adaptado de Eckert, 2003).

1.2.2. Tratamento farmacológico do transtorno bipolar

Nos últimos anos, o tratamento do TB tem avançado consideravelmente com o uso de anticonvulsivantes e, mais recentemente, de antipsicóticos atípicos. O tratamento medicamentoso visa restaurar o comportamento, controlar sintomas agudos e prevenir a ocorrência de novos episódios. O tratamento do transtorno bipolar é dividido em três fases: aguda, continuação e manutenção. Os objetivos do tratamento da fase aguda são: tratar mania sem causar depressão e/ou consistentemente melhorar depressão sem causar mania. A fase de continuação tem como meta: estabilizar os benefícios, reduzir os efeitos colaterais, tratar até a remissão, reduzir a possibilidade de recaída e aumentar o funcionamento global. Os objetivos do tratamento de manutenção são: prevenir mania e/ou depressão e maximizar recuperação funcional, ou seja, que o paciente continue em remissão (Matos e Souza, 2005).

Os fármacos que têm demonstrado eficácia no tratamento de manutenção do transtorno bipolar são o lítio, o valproato, a carbamazepina, além dos antipsicóticos típicos, como a clorpromazina e o haloperidol e dos atípicos olanzapina e risperidona (Matos e Souza, 2005). O lítio foi descoberto como um agente com propriedades antimaníacas há mais de 50 anos e ainda é considerado o medicamento de primeira escolha para o tratamento do transtorno bipolar. Porém, em 40% dos pacientes a terapia com lítio é insatisfatória devido a pobre resposta, contra indicação médica ou efeitos colaterais como prejuízo cognitivo e emocional ou ganho de peso (Okuma, 1993; Price e Henninger, 1994). A combinação de um antipsicótico com lítio ou valproato pode ser mais efetiva do que cada um deles isoladamente. Em casos de mania grave, recomenda-se como primeira opção a combinação de lítio e um antipsicótico atípico ou valproato com antipsicótico atípico (Work Group on Bipolar Disorder – WGBD, 2004). Contudo, os efeitos colaterais destas drogas são os principais fatores de não-adesão ao tratamento (Fagiolini et al., 2005).

O tratamento da mania consiste no gerenciamento de uma doença complexa, que envolve fatores biológicos, psicológicos e sociais. Portanto, apesar dos avanços nos métodos de pesquisa e dos atuais conhecimentos sobre os mecanismos de ação dos estabilizadores de humor, a fisiopatologia do TB está ainda distante de ser completamente entendida e a busca por novos agentes eficazes nesta doença e que apresentem menos efeitos adversos continua.

1.3. Ácido Fólico

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B que age como coenzima no metabolismo de compostos de um carbono (para revisão ver: Mattson e Shea, 2003; Coppen e Bolander-Gouaille, 2005). Folato é um termo genérico utilizado para o grupo de compostos heterocíclicos que possuem como características estruturais principais um grupo pteridina, um grupo ácido p-aminobenzóico (PABA) e uma cadeia de ácido glutâmico (glutamato) de pesos variáveis (ver Figura 6). A característica comum de todas folatos-coenzimas é a porção PABA da molécula (Djukic, 2007). O nome folato surgiu do termo em Latim – “folium”, que significa folha, pois foi isolada pela primeira vez a partir de folhas verdes, como o espinafre.

Para ser biologicamente ativo o ácido fólico necessita sofrer redução “in vivo” passando pelas formas intermediárias de dihidrofolato (DHF) e tetrahidrofolato (THF), pela adição de átomos de hidrogênio nas posições 7,8 e 5,6,7,8, respectivamente. Pode ainda ligar unidades de carbono, que inclui grupos metil (CH₃), metileno (CH₂), formil (-CHO-) ou formimino (-CHNH-) nas posições N⁵, N¹⁰ ou N^{5,10} conferindo ao folato a função de coenzima, em diferentes sistemas enzimáticos, como carreador dessas unidades de carbono em diferentes graus de oxidação. Os folatos não somente são modificados por redução, mas também pela ligação de resíduos de ácido glutâmico por ligação carboxil, podendo o folato apresentar até 12 resíduos de glutamato. Porém, a maioria dos folatos intracelulares é predominante penta ou

hexaglutamato, enquanto que o folato extracelular se encontra na forma de monoglutamato (para revisão ver Lucock, 2000).

O 5-metil-THF é a forma normalmente encontrada na circulação e tecidos (Bailey e Gregory, 1999; Ramaekers e Blau, 2004). O ácido fólico é o derivado 5-formil do ácido THF e participa como co-fator em muitas reações metabólicas, incluindo a síntese de purina e pirimidina e a conversão de aminoácidos. O ácido fólico é utilizado na clínica em terapia citotóxica como um antídoto para os antagonistas do ácido fólico (tais como o metotrexato) que bloqueiam a conversão do ácido fólico para tetraidrofolato por ligação à enzima diidrofolato-redutase e nos casos de deficiência de folato cerebral (Djukic, 2007).

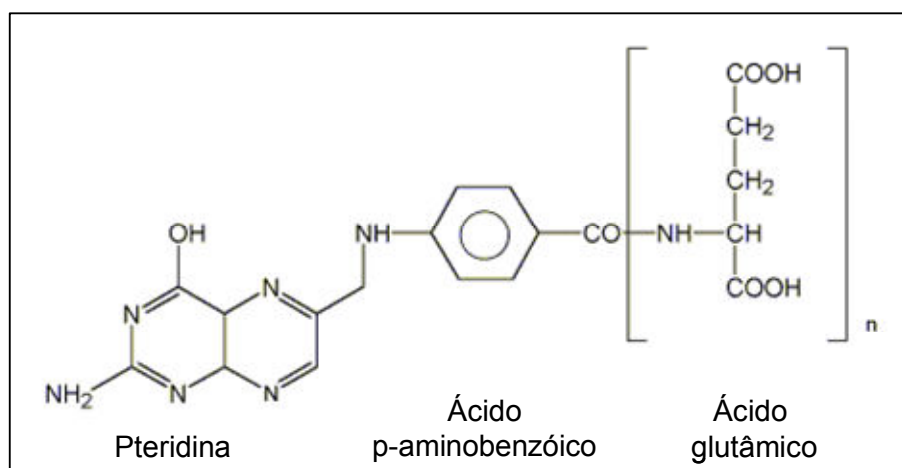


Figura 6. Estrutura química do ácido fólico

O folato é sintetizado por microorganismos e plantas superiores, mas não por mamíferos, para os quais é um nutriente essencial, necessitando ser ingerido através dos alimentos (McNulty, 1995). A obtenção do ácido fólico para o organismo humano pode ser feita através de dieta com alimentos ricos nesta vitamina, através de comprimidos ou por enriquecimento de alimentos com esta vitamina (para revisão ver Krishnaswamy e Madhavan, 2001). Alimentos como o feijão, ervilha, espinafre, brócolis, aspargo, frutas cítricas, grãos, leite, carne, fígado e verduras cruas possuem folato, porém a quantidade desejada pode não ser obtida somente com a dieta. A maioria dos folatos da dieta existe na forma de

poliglutamato, o qual é convertido na parede do intestino grosso para a forma de monoglutamato antes de ser absorvido na corrente sanguínea. A quantidade de folato absorvido por uma pessoa depende da biodisponibilidade do folato ingerido, da taxa de perda pela urina, pelas fezes e pelo catabolismo e pode ainda ser influenciada por condições patológicas, como má absorção ou fisiológicas, como crescimento, gravidez e lactação (Wagner, 1995).

O transporte de folato através das barreiras biológicas (gastrointestinal, plexo coróide e placentária) é regulado principalmente pelo carreador de folato reduzido e pelo receptor de folato (Ramaekers e Blau, 2004; para revisão ver Sabharanjak e Mayor, 2004). O fornecimento de folato para o sistema SNC é dependente de um transporte adequado através da barreira hematoencefálica. Dentro dos neurônios, parte do folato pode ser catabolizado por oxidação a DHF que pode ser convertido a THF pela enzima DHF redutases (Ramaekers e Blau, 2004).

O carreador de folato reduzido é um sistema de transporte de baixa afinidade que é expresso em uma variedade de tecidos. Ele opera quando em altas concentrações de folato. O transporte ativo é mediado pelo receptor de folato que opera em concentrações fisiológicas de folato e o transporta através das membranas biológicas (ver Figura 7). Sua função é dependente do pH (ótimo 5,8), sódio, glicose e da temperatura (para revisão ver Djukic, 2007).

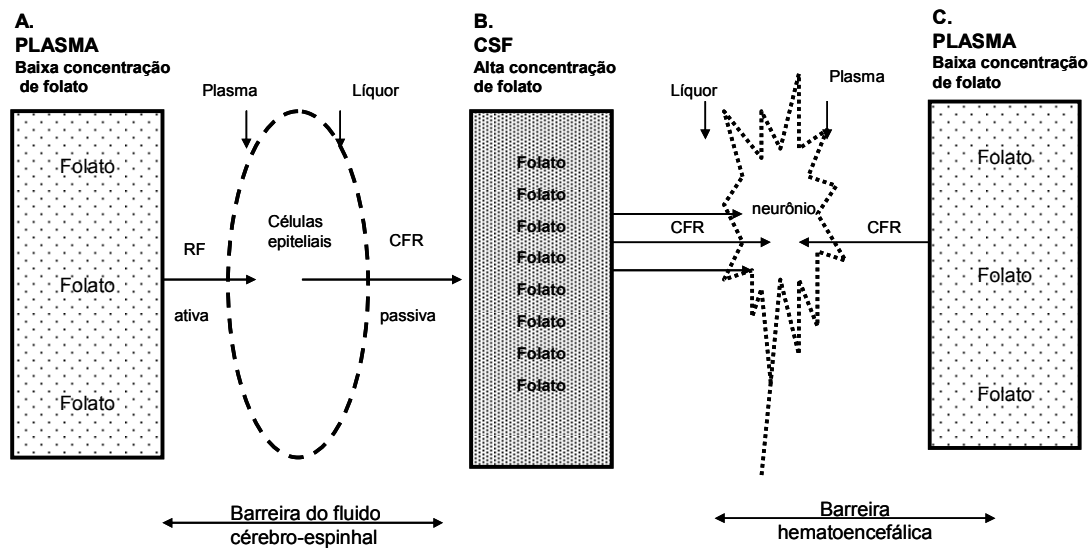


Figura 7. Transporte de folato através de seus receptores para o SNC. Do plasma (A) o folato é transportado para o plexo coróide via receptor de folato (RF). O carreador de folato reduzido (CFR) transporta folato do fluido cérebro-espinhal para os neurônios. A captação de folato para os neurônios é feita somente pelo CFR. Devido à alta concentração de folato no fluido cérebro-espinhal e a natureza do transporte através do carreador de folato ser passiva, o fluido cérebro-espinhal é a maior fonte de folato para os neurônios. (Adaptado de Djukic, 2007).

O ácido fólico desempenha várias funções no organismo: a) remete a homocisteína, um aminoácido citotóxico em concentrações elevadas, em metionina; b) participa na biossíntese de nucleotídeos; c) aumenta a biossíntese de tetrahydrobiopterina, a qual é coenzima para a hidroxilação de fenilalanina e triptofano na biossíntese de dopamina, noradrenalina e serotonina (Coppen et al., 1989), d) previne defeitos no tubo neural (para revisão ver Mattson e Shea, 2003; Coppen e Bolander-Gouaille, 2005); e) possivelmente exerce um papel neuroprotetor em danos ao SNC, por promover reparo e crescimento neuronal (Iskandar et al., 2004).

O metabolismo das vitaminas do complexo B e dos folatos está intimamente relacionado (ver Figura 8). A vitamina B₁₂ (cobalamina) atua como coenzima na conversão da homocisteína em metionina, recebendo o radical metila do metiltetraidrofolato (MTHF), transformando-se então em metilcobalamina, e cedendo-o à homocisteína, que se transforma

em metionina (Finkelstein, 1998). A vitamina B6 serve como co-fator na reação que converte irreversivelmente homocisteína em cistationina.

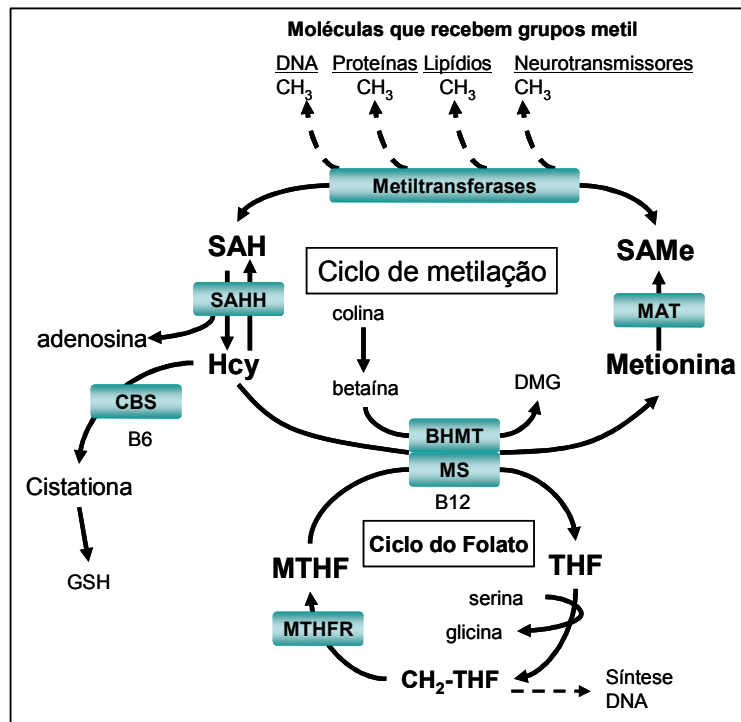


Figura 8. A relação entre o metabolismo do folato e o ciclo de metilação. O tetrahydrofolato (THF) é convertido em 5,10-metileno-tetrahydrofolato (5,10-MTHF) e em seguida reduzido a 5-metil-tetrahydrofolato (5-MeTHF) pela ação da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR), dirigindo assim um grupo metil para a formação da metionina, etapa catalisada pela ação da enzima metionina sintase (MS). A conversão de homocisteína (Hcy) em metionina serve como uma importante fonte de metionina para a síntese de s-adenosil-metionina (SAME), um importante agente de metilação in vivo. CBS= cistationina β-sintetase; SAH= S-adenosil homocisteína. (Adaptado de Bottiglieri, 2005).

Como a ingestão adequada de folato é vital para a homeostase e divisão celular, na sua deficiência, seja por ingestão inadequada ou por problemas de má-absorção, todas as reações do metabolismo do carbono estarão comprometidas em vários graus, dependendo das afinidades relativas das enzimas às respectivas moléculas envolvidas (Mason, 1995). Com isso, surgem mudanças bioquímicas que resultam em anormalidades e em conseqüências deletérias no metabolismo do carbono, pois as reações são afetadas e ocorre o acúmulo de

vários substratos e intermediários metabólicos, gerando, por exemplo, hiper-homocistemia (para revisão ver Scott e Weir, 1998).

A homocisteína é um aminoácido sulfuroso derivado da desmetilação da metionina, um aminoácido abundante em proteínas de plantas e animais e a principal fonte de átomos sulfurosos de proteínas. A homocisteína pode ser tanto remetilada para metionina, um processo que utiliza folato e vitamina B₁₂ como coenzimas, ou, se em excesso, catabolizada pela transulfuração em cistationina, usando a vitamina B₆ como coenzima (ver Figura 8; para revisão ver Finkelstein, 1998). Altos níveis de homocisteína estão associados com doenças do SNC como a depressão (Troen, 2005). As causas adquiridas da hiper-homocistemia incluem deficiências nas coenzimas (vitaminas B₁₂, B₆ e folato), idade avançada, doenças como insuficiência renal e hipotireoidismo, medicações que interferem no metabolismo das vitaminas B₁₂, B₆ ou folato e fatores ligados ao estilo de vida, como tabagismo, alcoolismo, dieta e falta de atividade física (para revisão ver Sachdev, 2004).

1.3.1. Ácido fólico e transtornos de humor

Estudos clínicos têm demonstrado que pacientes com depressão maior apresentam baixas concentrações plasmáticas e eritrocitárias de ácido fólico e que este fato pode estar associado a uma pobre resposta ao tratamento com antidepressivos (Fava et al., 1997; Alpert et al., 2000). Vários estudos têm demonstrado também que a suplementação com ácido fólico em pacientes deprimidos pode melhorar o efeito terapêutico de drogas antidepressivas, como por exemplo, a fluoxetina (Coppen e Bailey, 2000; Abou-Saleh e Coppen, 2006) uma vez que pacientes com depressão podem apresentar uma deficiência funcional de folato (para revisão ver Reynolds, 2002; Coppen e Bolander-Gouaille, 2005); e a severidade desta deficiência, indicada pelos elevados níveis de homocisteína, é correlacionada com a severidade da

depressão (Tiemeier et al., 2002). Além disso, baixos níveis de folato estão associados com uma pobre resposta ao tratamento com antidepressivos (Fava et al., 1997) e o folato participa da síntese de serotonina e noradrenalina, neurotransmissores implicados na fisiopatologia da depressão (para revisão ver: Mattson e Shea, 2003; Taylor et al., 2004).

Embora existam mais trabalhos mostrando a relação do ácido fólico com a depressão maior, existem algumas evidências que apontam a sua participação também na fisiopatologia da mania. Hasanah e colaboradores (1997) demonstraram que pacientes com mania apresentam níveis significativamente baixos de ácido fólico em eritrócitos, indicando que a deficiência do ácido fólico pode estar envolvida nesta doença. Acrescenta-se ainda, um estudo clínico que mostrou que a suplementação com ácido fólico aumenta o efeito profilático do lítio, em diminuir as co-morbidades afetivas (Coppen et al., 1986) e um relato de caso de uma paciente com transtorno misto de depressão e mania que apresentava deficiência de vitamina B₁₂ e folato e após a suplementação destas vitaminas apresentou remissão total dos sintomas (Fafouti et al., 2002).

2. Justificativa

Apesar dos recentes avanços no desenvolvimento de fármacos para o tratamento dos transtornos de humor nos últimos anos, a terapêutica ainda deixa muito a desejar. A terapia para a depressão, por exemplo, não tem sido totalmente eficaz e, em muitos casos, está associada a efeitos colaterais indesejados, o que prejudica a adesão do paciente ao tratamento (Nestler et al., 2002a). Além disso, apenas cerca de 60% dos pacientes são responsivos ao tratamento com antidepressivos (Gareri et al., 2000; Berton e Nestler, 2006). Já o tratamento para transtorno bipolar é paliativo, longo e não atende a casos refratários da doença (para revisão ver Müller-Oerlinghausen et al., 2002). Desta forma, o estudo do mecanismo neuroquímico dos transtornos de humor e a pesquisa de novos compostos e suas ações para o controle dos sintomas associados com estes transtornos se faz necessária.

Considerando que o ácido fólico é uma vitamina essencial: a) que participa do metabolismo de um carbono e está envolvido em várias reações bioquímicas (para revisão ver Mattson e Shea, 2003); b) há vários estudos clínicos que evidenciam o seu envolvimento com os transtornos de humor, como depressão maior (Fava et al., 1997; Alpert et al., 2000) e o transtorno bipolar (Hasanah et al., 1997) e que a suplementação com esta vitamina possibilita a melhora destes quadros clínicos (Coppen et al., 1986; Abou-Saleh e Coppen, 2006) c) existem poucos estudos pré-clínicos utilizando o ácido fólico nos modelos de transtornos de humor. Torna-se necessário e relevante investigar o envolvimento do ácido fólico na fisiopatologia da depressão maior e do transtorno bipolar para a melhor compreensão dos mecanismos de regulação endógena desses estados de humor contribuindo, desta forma, para o futuro desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para controle e/ou remissão dos sintomas associados a estas doenças.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido fólico em modelos animais de depressão maior e mania e analisar os mecanismos de ação do ácido fólico nestes modelos.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar se o ácido fólico exerce efeito antidepressivo quando administrado agudamente por via oral (p.o.) no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC), modelos animais preditivos de atividade antidepressiva;
- Verificar se o ácido fólico exerce efeito antidepressivo quando administrado cronicamente (30 dias) p.o. no TNF;
- Verificar se o ácido fólico e o ácido folínico exercem efeitos antidepressivos quando administrados agudamente por via intracerebroventricular (i.c.v.) no TNF;
- Investigar o efeito do ácido fólico sobre as alterações comportamentais induzidas pelo modelo de depressão do estresse imprevisível;
- Investigar o efeito da administração de homocisteína durante 30 dias no TSC;
- Investigar o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF;
- Investigar a participação do sistema glutamatérgico (via receptores NMDA) e da via da L-arginina-NO/GMPc na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF;
- Investigar a participação do sistema opióide na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF;
- Investigar a participação das vias de sinalização intracelular dependentes de PKA, MAPK/ERK, CaMKII e PKC na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF;

- Verificar o efeito da administração oral de ácido fólico, comparativamente ao LiCl (controle positivo), no modelo animal de mania induzido por ouabaína;
- Investigar o envolvimento do estresse oxidativo no efeito do ácido fólico, comparativamente ao LiCl (controle positivo), no modelo animal de mania induzido por ouabaína.

4. Materiais e métodos

4.1. Drogas e reagentes

Foram utilizados: ácido fólico, azul de metileno, tartarato de cetanserina, fluoxetina, H-89 (N-[2- (p-bromocinamilamina) etil]-5-isoquinolinasulfonamida), hidrocloreto de ioimbina, KN-62 (4-[2-[(5-isoquinolinil-sulfonil)metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1piperazinil)propil] fenil-éster), L-arginina, cloreto de lítio, L-NNA (NG-nitro-L-arginina), naloxona, naloxona metiodida, naloxonazina, 7-nitroindazol, NMDA (ácido N-metil-D-aspártico), ouabaína, PCPA (p-clorofenilalanina metil éster), PD98059, hidrocloreto de prazosim, queleritrina, SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina), sildenafil e WAY100635 (N-[2-[4-(2- metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-(2-piridinil) ciclohexanocarboxamida), adquiridos da Sigma (St Louis, MO, USA). MK-801 (maleato de dizocilpina) foi adquirido da Research Biochemicals International (USA) e morfina da Merck (Alemanha).

4.2. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* de ambos os sexos, pesando 30-40 g e ratos Wistar machos adultos, pesando 250-350 g, mantidos a 22-25°C com livre acesso à água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00h). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Todas as manipulações foram feitas entre as 8:00 e 17:00 h, sendo cada animal utilizado somente uma vez. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.3. Tratamento

O ácido fólico foi diluído em água destilada ou em salina para administração por via oral (p.o.) e por via intracerebroventricular (i.c.v.), respectivamente. As demais drogas utilizadas foram diluídas em solução salina, com exceção do LiCl que foi diluído em água destilada. As drogas H-89, PD98059, KN-62, queleritrina e NMDA foram administradas pela via i.c.v. e as drogas morfina, naloxona metiodida e WAY100635 foram administradas por via subcutânea (s.c.). As demais drogas utilizadas foram administradas pela via intraperitoneal (i.p.). Os volumes administrados foram 10 ml/kg de peso corporal (administração p.o., s.c. e i.p.) e 5 µl/sítio (administração i.c.v.). A administração via i.c.v. foi realizada como descrito por Kaster et al. (2007a). As injeções foram feitas através da inserção de uma agulha conectada por uma cânula de propileno à micro-seringa Hamilton de 25 µl, diretamente no terceiro ventrículo usando-se a bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade).

4.4. Testes comportamentais

O uso de modelos animais na pesquisa pré-clínica tem proporcionado ferramentas para a identificação e estudo de novos compostos com atividade terapêutica e também tem auxiliado na elucidação dos mecanismos neurobiológicos dos transtornos mentais (Andreatini, 2002).

Os modelos animais de transtornos de humor devem cumprir um mínimo de pré-requisitos, entre eles: ter analogia com a doença humana na sua manifestação ou sintomas; existir uma mudança comportamental no animal que possa ser controlada objetivamente; as mudanças comportamentais alteradas no animal devem ser revertidas pelo mesmo tratamento

utilizado em seres humanos e ter reprodutibilidade (McKinney e Bunney, 1969; Willner, 1984).

Nem todos os sintomas dos transtornos de humor como: melancolia, sentimento de culpa e a ciclicidade entre os sintomas de depressão e mania ou vice-versa são reproduzidos nestes modelos animais. No entanto, alguns sintomas da depressão e de mania podem ser induzidos nestes modelos. Como exemplos, os modelos de estresse podem induzir no animal uma condição similar a distímia em humanos, além de provocar anedonia (perda do prazer a estímulos anteriormente prazerosos) a qual é um dos sintomas da depressão (Willner, 1997) e o modelo da ouabaína pode induzir em ratos a agitação psicomotora, sintoma clínico da fase maníaca do transtorno bipolar (El-Mallakh et al., 1995).

Neste trabalho utilizamos os testes de desespero comportamental: teste do nado forçado (TNF) e o teste da suspensão da cauda (TSC), que são testes amplamente utilizados como preditivos de atividade antidepressiva e os modelos que induzem comportamento depressivo: o modelo de estresse imprevisível e o da hiperhomocisteinemia. Para estudar o efeito do ácido fólico na fase de mania do transtorno bipolar nós utilizamos o modelo da hiperlocomoção induzida por ouabaína em ratos.

4.4.1. Teste do nado forçado (TNF)

O teste do nado forçado foi proposto por Porsolt et al. (1977) a fim de estudar substâncias com uma possível ação antidepressiva. Neste modelo o animal é submetido a uma situação da qual não há saída, o nado forçado, e o tempo de imobilidade do animal é cronometrado durante 6 minutos (Porsolt et al., 1979). Um animal é considerado imóvel quando flutua na água ou quando realiza movimentos necessários apenas para manutenção da sua cabeça acima do nível da água. Esta avaliação foi realizada em um cilindro plástico de 10

cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Eckeli et al., 2000; Da Silva et al., 2000, Zomkowski et al., 2002). Embora este modelo não reproduza adequadamente a sintomatologia da depressão em humanos, ele parece ter um alto valor preditivo na investigação de drogas antidepressivas (Willner, 1984), uma vez que os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Porsolt et al., 1977; Cryan et al., 2002).

4.4.2. Teste da suspensão da cauda (TSC)

Este teste foi proposto por Steru e colaboradores (1985) como alternativa ao TNF para o estudo de compostos com possível atividade antidepressiva. O tempo total de imobilidade foi avaliado durante 6 minutos em camundongos isolados visualmente e acusticamente, suspensos pelo menos 50 cm acima do chão com uma fita adesiva colocada aproximadamente a 1 cm da ponta da cauda. Os antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade dos animais neste teste (Cryan et al., 2002).

4.4.3. Atividade locomotora na caixa de locomoção

Para excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade nos TNF ou no TSC seja consequência de uma estimulação motora, os animais foram avaliados na caixa de locomoção. A caixa é de madeira e mede 40x14x20 cm, possui uma grade no chão e é equipada com 3 fotocélulas posicionadas a 2 cm do chão e espaçadas ao longo do eixo longitudinal. Os animais foram habituados na caixa por 2 h antes de receber os tratamentos. A atividade locomotora na caixa foi registrada durante 15 minutos por um contador digital acoplado às fotocélulas.

4.4.4. Modelo de depressão induzida por estresse imprevisível em camundongos

O protocolo do estresse imprevisível aplicado neste trabalho foi uma modificação do utilizado por Lu et al. (2006). Os animais foram submetidos a diversos agentes estressores (Tabela 1), diariamente e em diferentes horários, por 14 dias. Os animais foram alojados em gaiolas individuais uma semana antes do início e durante o protocolo do estresse imprevisível. O grupo controle permaneceu numa sala diferente dos animais dos grupos submetidos ao estresse imprevisível. Neste modelo, a exposição dos camundongos a diversos tipos de agentes estressores induz comportamentos tipo-depressivo (McArthur e Borsini, 2006) como diminuição na frequência de limpeza corporal (Yalcin et al., 2005). Vinte e quatro horas após o último tratamento os camundongos foram avaliados no TSC.

Dia	Agente	Horário
1	Confinamento (2 h)	11 h – 13 h
2	Banho frio (15°C – 10 min)	10 h – 10:20 h
3	Privação de água e comida (16 h)/Inversão do Ciclo	18 h – 10 h
4	Inversão do Ciclo (24 h)	10 h – 10 h
5	Prendedor na cauda (10 min)	16 h – 16:10 h
6	Pareamento com tela e maravalha molhada (3 h)	13 h – 16 h
7	Choque (0,7 mA – 3 s/min por 3 min)	14 h
8	Cheiro do predador (1 h) Maravalha molhada (16 h)	12 h – 13 h 18 h – 10 h
9	Pareamento com tela (3 h)	13 h – 16 h
10	Banho frio (15°C – 15 min)	14 h
11	Prendedor na cauda (15 min)	11 h
12	Confinamento (2 h) Maravalha molhada e caixa inclinada 45° (16 h)	10 h – 12 h 18 h – 10 h
13	Choque (0,7 mA – 3 s/min por 3 min)	13 h
14	Cheiro do predador (1 h)	11 h – 12 h

Tabela 1. Protocolo do estresse imprevisível.

4.4.5. Modelo de depressão induzida por homocisteína

Neste modelo os camundongos foram tratados com homocisteína (200 mg/kg, p.o., gavagem) durante 30 dias. Vinte e quatro horas após o último tratamento os camundongos foram avaliados no “splash test” e no TSC.

4.4.6. Comportamento de auto-limpeza (“splash test”)

O “splash test” é utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (“grooming”) dos animais, após a borrifação dos mesmos com solução de sacarose a 10%. A latência para o início do comportamento de auto-limpeza e o tempo em que o animal permaneceu neste comportamento foi cronometrado durante 5 minutos (Ducottet e Belzung, 2004). O “splash test” é um válido marcador comportamental para modelos de indução ao estresse, uma vez que os animais submetidos a estes modelos apresentam um menor tempo de auto-limpeza quando comparados aos animais controle (Kalueff et al., 2004). Os antidepressivos diminuem a latência para o início do comportamento de auto-limpeza e ou aumentam o tempo dispendido neste comportamento (Yalcin et al., 2005).

4.4.7. Modelo de mania induzida por ouabaína em ratos

Este modelo foi proposto por El-Mallakh e colaboradores (1995) como um modelo agudo de mania e consiste na injeção i.c.v. de ouabaína, droga inibidora da bomba Na^+K^+ -ATPase, a qual gera hiperlocomoção nos ratos. Este modelo foi desenvolvido baseado no fato

de que em pacientes, a atividade bomba Na^+K^+ -ATPase está diminuída na mania (Looney e El-Mallakh, 1993; Rose et al., 1998).

4.4.8. Atividade locomotora no campo aberto

Para investigar o efeito do ácido fólico no modelo de mania induzido por ouabaína os ratos foram testados no campo aberto. O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com chão dividido em 12 quadrados iguais. A parte frontal da caixa é de vidro, para facilitar o trabalho do observador. O número de quadrados cruzados com todas as patas por sessão foi o parâmetro usado para avaliar a atividade locomotora. Cada sessão teve a duração de 5 minutos (Belzung, 1999).

4.5. Avaliação do estresse oxidativo nos animais do modelo de mania

Com o objetivo de verificar um possível estresse oxidativo em consequência da administração intracerebroventricular de ouabaína, foram mensurados os parâmetros antioxidantes: os níveis de GSH-t e a atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) e os níveis de TBARS como marcador de dano oxidativo, em córtex cerebral e hipocampo dos ratos.

4.5.1. Preparação de extrato dos tecidos

Após 6 h da administração de ouabaína os animais foram mortos por decapitação e seus encéfalos foram removidos sobre uma placa de Petri invertida colocada sobre o gelo. As

estruturas cerebrais (córtex cerebral e hipocampo) foram isoladas e homogeneizadas em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4° C). O sobrenadante foi então separado e conservado a -70° C para posterior dosagem das atividades enzimáticas (GPx e GR) e mensuração dos níveis de TBARS. Para as dosagens do conteúdo de GSH-t, os tecidos foram homogeneizados em ácido perclórico 0,5 M e em seguida centrifugados a 15.000 g por 2 min (4° C). O sobrenadante foi separado e neutralizado (diluição 10 x) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0).

4.5.2. Mensuração dos níveis de glutathiona total (GSH-t)

O método utilizado é enzimático e cíclico, descrito originalmente descrito por Tietze (1969), e posteriormente modificado por Akerboom e Sies (1981). Este método detecta tanto a forma oxidada (GSSG) quanto à forma reduzida (GSH) da glutathiona, o que então é definido como glutathiona total (GSH-t). O reagente de Ellman, DTNB ao reagir com GSH, forma o ácido tionitrobenzóico (TNB) e seu dissulfeto misto com a GSH (GS-TNB). A formação de TNB detectado espectrofotometricamente em 412 nm. A ação catalítica da GR depende da presença de NADPH como co-fator, resultando em GSH e TNB, desenvolvendo mais cor (Eyer e Podhradský, 1986). A reentrada no ciclo acontece com a reação de GSH com DTNB. Caso haja presença de GSSG, esta é primeiramente reduzida a GSH pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) e, em seguida, entra no ciclo. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 412 nm por 2 min. Neste ensaio, o meio de reação consistia de tampão fosfato de potássio 0,1 M, 1 mM EDTA, pH 7,0, DTNB 0,1 mM; NADPH 0,2 mM. Iniciava-se a reação pela adição da GR 0,2 U/mL na presença de GSH e/ou GSSG. A reação basal, sem a presença de GSSG ou amostra, foi descontada do delta de absorbância por minuto obtido na presença do padrão ou da amostra. A construção de uma curva padrão era realizada pela

adição de uma concentração conhecida de GSH (0,1 a 1 nmol/mL) ou GSSG (0,05 a 0,5 nmol), anotando-se a variação de absorbância/minuto. A concentração de GSH-t foi obtida pela comparação com a curva padrão.

4.5.3. Avaliação da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução de H_2O_2 e de lipoperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato para esta reação e produzindo glutathione oxidada (GSSG). No ensaio, esta reação é acoplada a redução de GSSG, que é proporcionada pela adição de GR e NADPH ao meio de reação. O consumo de NADPH pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (Wendel, 1981; Flohé e Günzler, 1984), e é proporcional a atividade GPx, uma vez que o excesso de GR não permite o acúmulo de GSSG. Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM. Para permitir a ativação da enzima GPx por GSH, a leitura espectrofotométrica foi realizada 4 minutos após a adição das amostras (contendo GPx) ao meio de reação. Para início da reação específica adiciona-se o substrato peróxido de cumeno ao meio de reação contendo a amostra a ser analisada e então feita uma leitura por 2-4 minutos a 340 nm. Ao decréscimo de absorbância (340 nm) por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH, que é obtido quando se omite a adição de substrato. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de NADPH ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como nmol/min/mg de proteína, ou mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

4.5.4. Avaliação da atividade da enzima glutationa redutase (GR)

A GR catalisa a redução da glutationa oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Calberg e Mannervik, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, NADPH 0,2 mM. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi mensurado por 2-4 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato (GSSG 1 mM) a leitura foi realizada por 2-4 min adicionais e do decaimento por minuto obtido foi descontado o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de NADPH ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O valor foi expresso como nmol/min/mg de proteína, ou mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

4.5.5. Mensuração dos níveis de TBARS

A lipoperoxidação foi estimada pela detecção dos derivados de lipoperóxidos, através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malonildialdeído (MDA), que devido à peroxidação de lipídios forma um produto de coloração rosa (Ohkawa et al., 1979). Desta forma, neste trabalho utilizaremos o termo lipoperoxidação para nos referir a estas medidas.

Os sobrenadantes dos homogenatos foram incubados em banho-maria com ácido tricloroacético 30% durante 30 min, a 37° C. Em seguida, foi adicionado ácido tiobarbitúrico 0,73% a este meio que permaneceu em fervura por 60 min. Após, este período o material foi

resfriado durante 15 min a 4° C e posteriormente centrifugado (5 min a 5000 g). A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm.

4.5.6. Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (1976). A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm usando albumina de soro bovino como padrão.

4.6. Protocolos Experimentais

O protocolo experimental usado para a curva dose-resposta do ácido fólico está ilustrado no esquema abaixo.

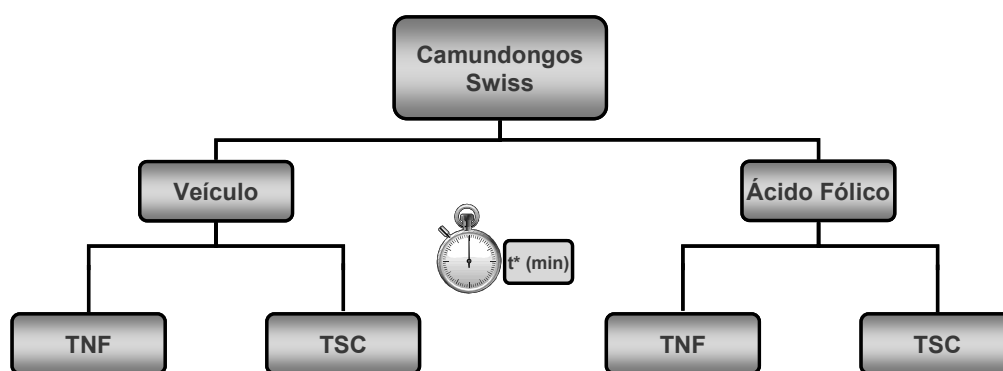


Figura 9. Esquema do protocolo usado na curva dose-resposta do tratamento com ácido fólico.

*t= tempo em minutos para a realização dos testes comportamentais após a administração do ácido fólico ou controle. Nos experimentos aonde a via de administração foi i.c.v. o tempo é de 15 minutos e na via oral é de 60 minutos.

4.6.1. Curva dose resposta do tratamento agudo com ácido fólico e ácido folínico

Com a finalidade de investigar o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF e no TSC, os animais receberam por gavagem água (grupo controle) ou ácido fólico (1-100 mg/kg, p.o). Decorridos 60 minutos, os animais foram submetidos ao TNF ou TSC (ver Figura 7). A atividade locomotora foi avaliada em um outro grupo de animais tratados com as mesmas doses testadas no TNF e no TSC. Os animais foram testados na caixa de locomoção após 2 h de habituação.

Alternativamente, um grupo de animais foi tratado com ácido fólico (0,1-10 nmol/sítio, i.c.v.) ou salina. Decorridos 15 minutos após o tratamento os animais foram testados no TNF e no TSC. Os animais foram testados na caixa de locomoção após 2 h de habituação.

Em outro experimento, ácido folínico, um metabólito do ácido fólico, foi administrado por via i.c.v. (1-10 nmol/sítio) 15 minutos antes do TNF. A atividade locomotora foi feita em um grupo de animais independentes 15 minutos depois da administração do ácido folínico nas doses que tiveram efeito no TNF.

4.6.2. Curva dose resposta do tratamento crônico com ácido fólico

Os animais receberam ácido fólico (1-100 mg/kg, p.o.) por 30 dias e 24 h após a última administração foram testados no TNF.

4.6.3. Efeitos do ácido fólico no modelo de estresse imprevisível durante 14 dias

Os camundongos foram submetidos ao protocolo de estresse imprevisível (EI) durante 14 dias. Neste protocolo os animais receberam ácido fólico (10 e 100 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o., controle positivo) do 7º até o 14º dias de EI e 24 h após o último tratamento foram testados no TSC.

4.6.4. Estudo do mecanismo de ação do ácido fólico na depressão

Nesta etapa do estudo foi utilizado o TNF para analisar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antidepressiva do ácido fólico, por ser um teste de melhor reprodutibilidade e de mais fácil execução do que o TSC. Para este fim, foi utilizado ácido fólico na doses sub-ativas de 10 mg/kg, p.o. e 1 nmol/sítio, i.c.v. para os experimentos onde o objetivo era verificar um efeito antidepressivo sinérgico com outras drogas. As doses ativas de 50 mg/kg, p.o. e 10 nmol/sítio, i.c.v. foram utilizadas para os experimentos nos quais estava sendo investigada a reversão do seu efeito por outras drogas. As doses dos antagonistas e agonistas farmacológicos e inibidores enzimáticos utilizados nestes experimentos foram selecionadas com base em dados da literatura ou então baseadas em resultados prévios do laboratório (Redrobe e Bourin, 1997; Eckeli et al., 2000; Rodrigues et al., 2002; Rosa et al., 2003; Kaster et al., 2005; Zomkowski et al., 2002, 2005; Almeida et al., 2006; Kaster et al., 2007a,b; Kulkarni e Dhir, 2007; Machado et al., 2007).

Os experimentos foram realizados de acordo com o esquema ilustrado abaixo.

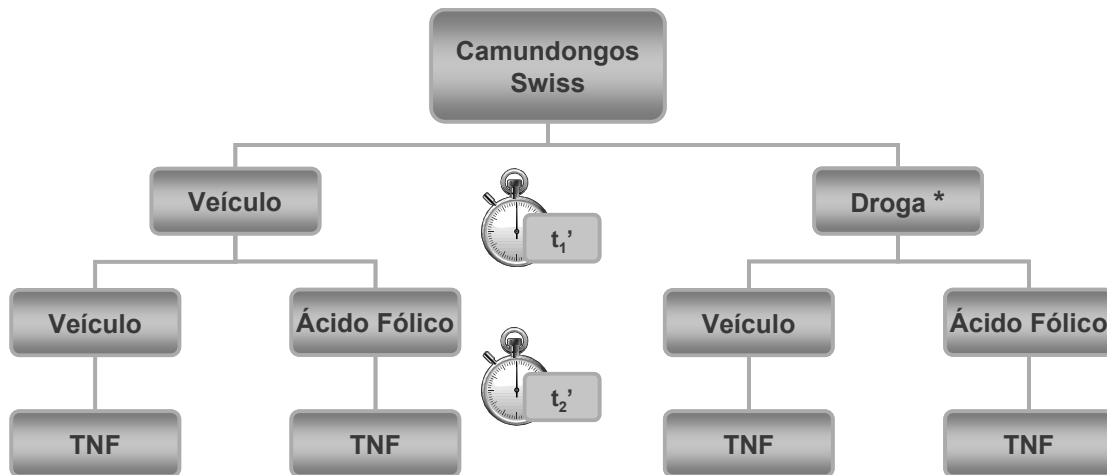


Figura 10. Esquema do protocolo utilizado para estudar mecanismo de ação do ácido fólico.
 *Droga= agonistas ou antagonistas de receptores dos sistemas estudados.
 t_1 e t_2 = tempo do intervalo em minutos entre a administração das drogas e o início do TNF.

4.6.5. Envolvimento do sistema serotoninérgico e noradrenérgico

Para investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do ácido fólico os animais foram pré-tratados com o inibidor da síntese de serotonina, p-clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., uma vez por dia por 4 dias consecutivos). Vinte e quatro horas após a última injeção de PCPA, foi realizado o tratamento dos animais com ácido fólico (50 mg/kg, p.o.), fluoxetina (20 mg/kg, p.o. controle positivo) ou água e os animais foram submetidos ao TNF após 60 minutos. Nós também investigamos o efeito do ácido fólico em potencializar o efeito antidepressivo da fluoxetina. Para este fim, os camundongos receberam ácido fólico (10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) ou água. Após 60 minutos os animais foram testados no TNF.

Com o objetivo de investigar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito antidepressivo do ácido fólico, os animais foram pré-tratados com WAY100635 (0,1 mg/kg,

s.c., um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) ou salina e após 30 minutos os animais receberam ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) ou água e 60 minutos depois foram testados no TNF. Em outro experimento para testar a habilidade do WAY100635 em potencializar o efeito antidepressivo de uma dose sub-ativa do ácido fólico, os animais foram pré-tratados com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.) ou salina e após 30 minutos receberam ácido fólico (10 mg/kg, p.o.) ou água e 60 minutos depois foram testados no TNF.

Em uma série de experimentos independentes, para investigar o envolvimento dos receptores 5-HT₂ no efeito do ácido fólico no TNF, os camundongos foram pré-tratados com cetanserina (5 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) ou salina, e após 30 minutos eles receberam ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) ou água e foram testados 60 minutos depois no TNF.

Para acessar o possível envolvimento do sistema noradrenérgico na atividade antidepressiva do ácido fólico, os animais foram pré-tratados com prazosin (1 mg/kg, i.p., um antagonista α_1 -adrenoceptores) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., um antagonista α_2 -adrenoceptores), e após 30 minutos eles receberam ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) ou água e foram testados 60 minutos após no TNF.

Todos os experimentos descritos nesta seção foram realizados também com animais que receberam ácido fólico por via i.c.v. (10 nmol/sítio, dose ativa e 1 nmol/sítio, dose sub-ativa). Neste protocolo, o TNF foi realizado 15 min após a administração de ácido fólico.

4.6.6. Envolvimento dos receptores NMDA na ação antidepressiva do ácido fólico

Para testar a hipótese de que o efeito antidepressivo do ácido fólico é mediado através da inibição de receptores NMDA, os animais foram pré-tratados com NMDA (0,1 pmol/sítio,

i.c.v.) e 15 minutos após receberam ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) ou salina. Decorridos 15 minutos os animais foram testados no TNF.

Em outro experimento a fim de verificar se havia um efeito sinérgico do ácido fólico com antagonista de NMDA os animais foram pré-tratados com uma dose sub-ativa de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p., antagonista não competitivo de receptores NMDA), 30 minutos após receberam ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.). Decorridos 15 minutos foram testados no TNF.

4.6.7. Envolvimento da via L-arginina NO na ação antidepressiva do ácido fólico

Para investigar a participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF, os camundongos foram pré-tratados com L-arginina, um precursor do NO (750 mg/kg, i.p.) ou com SNAP (25 µg/sítio, i.c.v., um doador de NO) em doses que *per se* não produzem efeito no TNF. Após 30 minutos do tratamento com L-arginina e 15 minutos após o SNAP os animais receberam ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) ou salina. Decorridos 15 min os animais foram submetidos ao TNF.

Em outro experimento, foi investigado o efeito sinérgico de uma dose sub-ativa de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) com uma dose sub-ativa de 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p., um inibidor específico da NOS neuronal) ou azul de metileno (10-20 mg/kg, i.p., um inibidor de NOS e a da GCs). Ácido fólico foi administrado 20 minutos depois das drogas e os animais foram testados no TNF 15 minutos depois.

Para investigar o papel do GMPc na ação antidepressiva do ácido fólico, camundongos receberam uma injeção de sildenafil (5 mg/kg, i.p., um inibidor da fosfodiesterase 5), ou veículo 30 minutos antes do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) e 15 minutos após foram testados no TNF.

4.6.8. *Envolvimento do sistema opióide na ação antidepressiva do ácido fólico*

Para investigar o envolvimento do sistema opióide na atividade antidepressiva do ácido fólico, os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de receptores opióides), naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c., antagonista não seletivo de receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica) ou salina. Depois de 30 minutos os animais receberam injeção de ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) ou salina. Decorridos 15 minutos os animais foram avaliados no TNF.

Para verificar a ativação do sistema opióide pelo ácido fólico, os camundongos foram pré-tratados com uma dose sub-ativa de morfina (1 mg/kg, s.c., um agonista não-seletivo de receptores opióides) e tratados 30 minutos após com uma dose sub-ativa de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.). Decorridos 15 minutos os animais foram testados no TNF.

Em outra série de experimentos para investigar o envolvimento dos sub-tipos de receptores opióides no efeito antidepressivo do ácido fólico, os camundongos foram pré-tratados com naltrindol (3 mg/kg, um antagonista seletivo de receptores δ -opióide), ou naloxonazina (10 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores μ 1-opióides) ou veículo e após 30 minutos e 24 h, respectivamente eles receberam ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) ou salina antes de serem testados 15 minutos depois no TNF.

Para investigar o envolvimento do sistema opióide com a inibição dos receptores NMDA animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo dos receptores opióides) e tratados com doses sub-ativas de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) e de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) que produziram um efeito sinérgico no TNF. Os animais foram testados no TNF 15 minutos após o tratamento com o ácido fólico.

4.6.9. Envolvimento das cascatas de sinalização celular na ação antidepressiva do ácido fólico

Para investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito antidepressivo agudo do ácido fólico, foram utilizados inibidores específicos de proteínas cinases. Os animais foram pré-tratados com veículo ou com os seguintes compostos: H-89 (um inibidor da PKA, na dose de 1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.), PD98059 (um inibidor da MAPK/ERK cinase, na dose de 5 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.), KN-62 (um inibidor da CaMKII, na dose de 1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.), queleritrina (um inibidor da PKC, na dose de 1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.). Depois de 15 minutos, os camundongos receberam ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) e decorridos 15 minutos, eles foram submetidos ao TNF.

4.6.10. Investigação do efeito do ácido fólico nas alterações comportamentais e bioquímicas ocasionadas pelo modelo de mania induzido por ouabaina em ratos

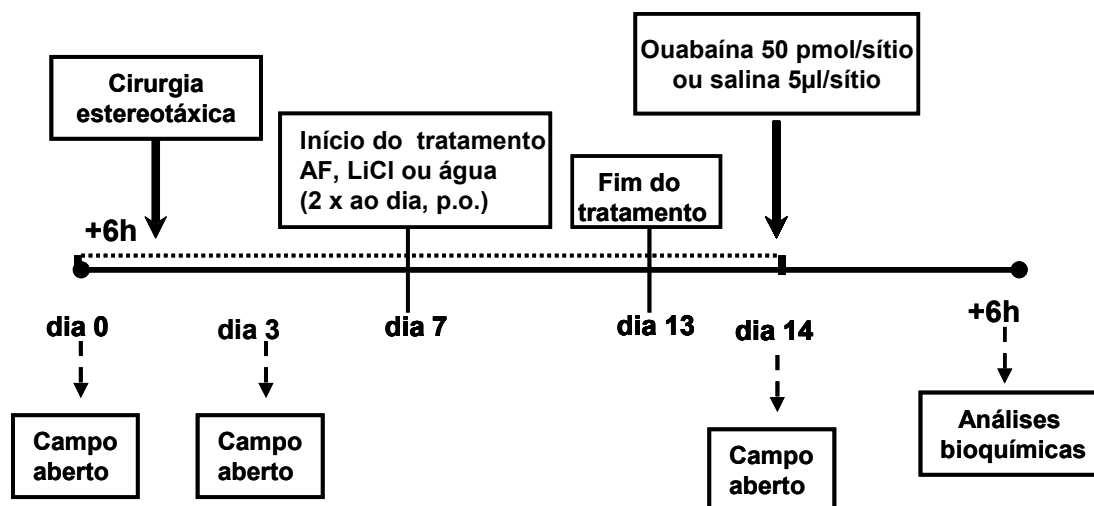


Figura 11. Esquema do protocolo utilizado para estudar os efeitos do ácido fólico no modelo de mania induzido por ouabaina.

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (35 mg/kg, 1 ml/kg, i.p.) (Thionembatal Abbott Laboratories) e xilazina (10 mg/kg, i.m.) (Virbaxyl, Virbac Laboratories) e a cânula foi cirurgicamente implantada no terceiro ventrículo. Os animais foram posicionados em um estereotáxico (Insight Equipamentos, Brazil) e a cânula de aço (25G, 12 mm de comprimento), 3 mm acima do ventrículo lateral usando as coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1998): plano anterior/posterior 0,9 mm do bregma; plano lateral 1,5 mm e plano ventral 3,5 mm. A cânula foi fixada com cimento poliacrílico e este foi ancorado no crânio com parafusos de aço.

Conforme mostrado na Figura 11 os animais foram canulados no dia zero. O período de tratamento dos animais com ácido fólico (10-100 mg/kg, p.o.) ou LiCl (controle positivo, 45 mg/kg, p.o.) foi do 7º até o 13º dia. No 14º dia, os animais receberam uma injeção de ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.) ou salina. O teste do campo aberto foi realizado no dia 0 (4 h antes da canulação), 3 dias após a canulação (para excluir efeitos da cirurgia sobre a atividade locomotora) e no 14º dia (imediatamente após a injeção i.c.v. de ouabaína ou salina). Decorridas 6 h, os animais foram mortos por decapitação. Córtices cerebrais e hipocampus foram removidos e homogenizados para posteriores dosagens bioquímicas (Figura 11).

4.7. Análise estatística

Para análise dos resultados foi efetuada a análise de variância (ANOVA) de uma ou de duas vias, de acordo com o protocolo experimental, seguida do teste post-hoc de Newman Keuls ou Tukey, quando apropriado. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Efeitos do ácido fólico em modelos animais de depressão

5.1.1. Efeitos do tratamento por via oral com ácido fólico no TNF, TSC e na atividade locomotora em camundongos

Os resultados descritos na Figura 12A e 12B mostram a curva dose-resposta do ácido fólico administrado por via oral no TNF e TSC, respectivamente. A redução do tempo de imobilidade ocorreu nas doses de 50 e 100 mg/kg no TNF, e nas doses de 10 e 50 mg/kg no TSC. A Figura 12C mostra que quando administrado nas doses ativas no TNF e no TSC, o ácido fólico não produziu efeito psicoestimulante em camundongos testados em caixa de locomoção após 2 h de habituação.

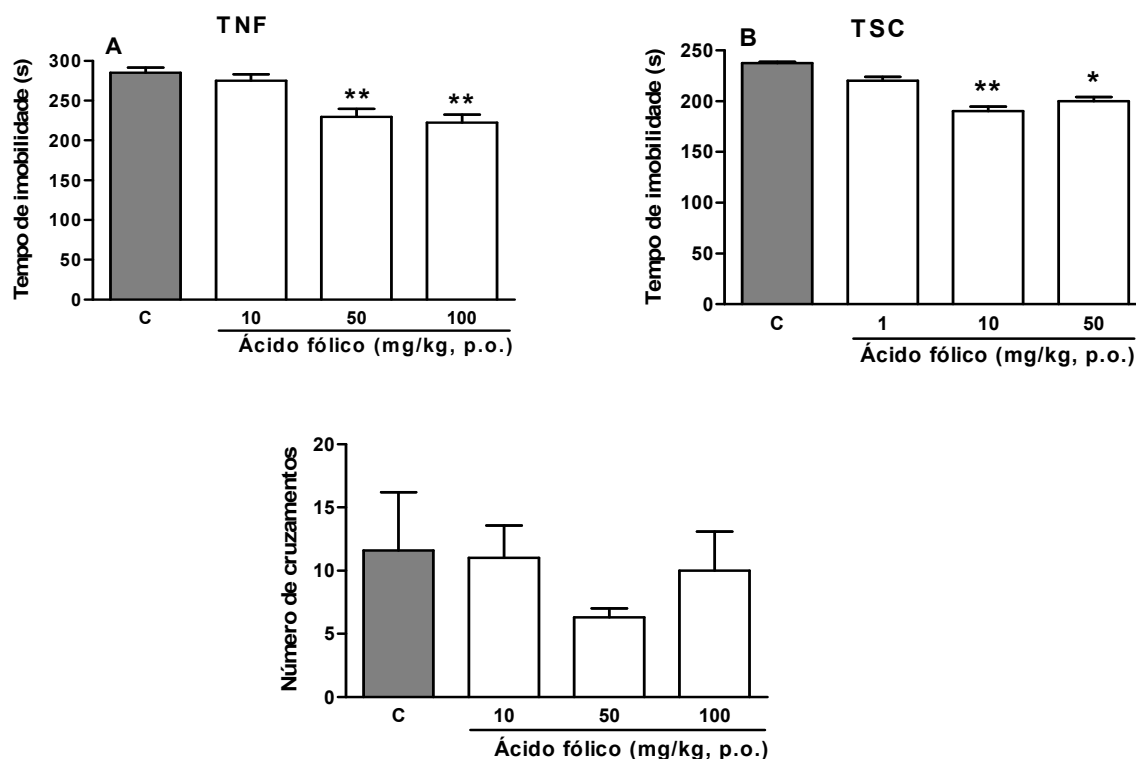


Figura 12. Efeito da administração aguda do ácido fólico por via oral no TNF (A), no TSC (B) e na atividade locomotora (C). Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 5-7$). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. A) tratamento ($F_{3,24} = 11,21$, $P < 0,01$). B) ($F_{3,20} = 5,71$, $P < 0,01$); C) ($F_{3,19} = 0,81$, $P = 0,50$).

Os resultados da Figura 13 mostram a curva dose-resposta da administração de ácido fólico (1-100 mg/kg, p.o.) durante 30 dias no TNF. A redução do tempo de imobilidade ocorreu nas doses de 50 e 100 (mg/kg, p.o.) no TNF (painel A). Figura 13B mostra que quando administrado nas doses ativas no TNF o ácido fólico não produziu efeito psicoestimulante em camundongos testados no campo aberto, quando testado na faixa de doses de 1- 100 mg/kg, p.o.).

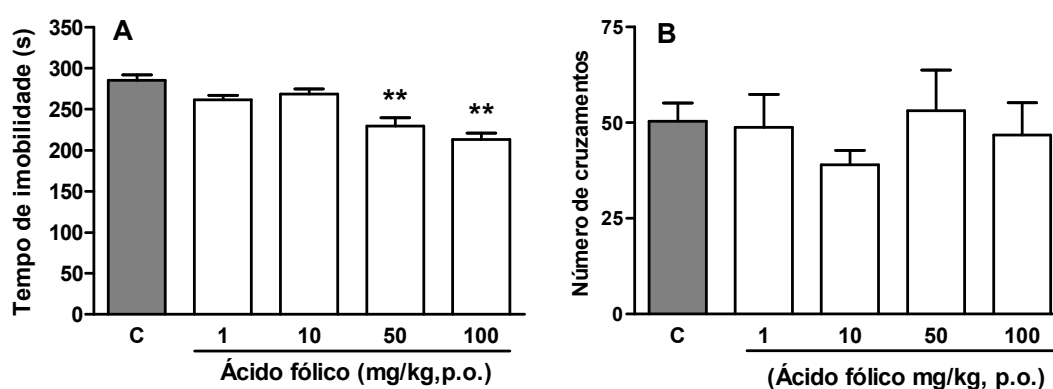


Figura 13. Efeito da administração durante 30 dias do ácido fólico por via oral no TNF (A) e na atividade locomotora (B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 6-7$). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. A) tratamento ($F_{4,29} = 15,67$ $P < 0,01$); B) ($F_{4,26} = 0,49$ $P = 0,74$).

5.1.2. Efeitos do tratamento agudo por via i.c.v. com ácido fólico e com ácido folínico no TNF e na atividade locomotora em camundongos

Os resultados descritos na Figura 14A e 14B mostram a curva dose-resposta do ácido fólico administrado por via i.c.v. no TNF e TSC, respectivamente. A redução do tempo de imobilidade ocorreu na dose de 10 nmol/sítio no TNF, e nas doses de 1 e 10 nmol/sítio no TSC. A Figura 14C mostra que quando administrado nas doses ativas no TNF e no TSC, o

ácido fólico não produziu efeito psicoestimulante em camundongos testados em caixa de locomoção após 2 h de habituação.

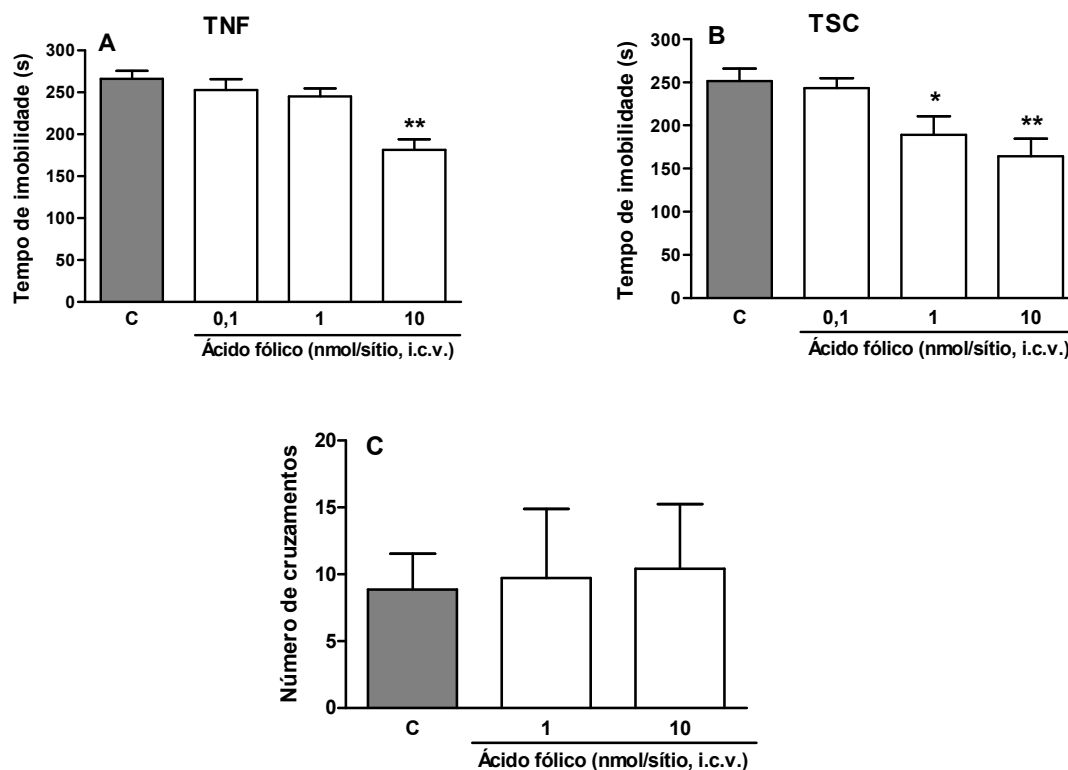


Figura 14. Efeito da administração aguda do ácido fólico por via i.c.v. no TNF (A), no TSC (B) e na atividade locomotora (C). Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 6-8$). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. A) tratamento ($F_{3,22} = 12,31$, $P < 0,01$). B) tratamento ($F_{3,22} = 5,50$, $P < 0,01$). C) ($F_{2,18} = 0,032$, $P = 0,96$).

Os resultados descritos na Figura 15A mostram o efeito da administração central (i.c.v.) de ácido folínico, um metabólito ativo do ácido fólico no TNF. A Figura 15B mostra que quando administrado na dose que produziu efeito no TNF (10 nmol/sítio, i.c.v.), o ácido folínico não produziu alterações locomotoras.

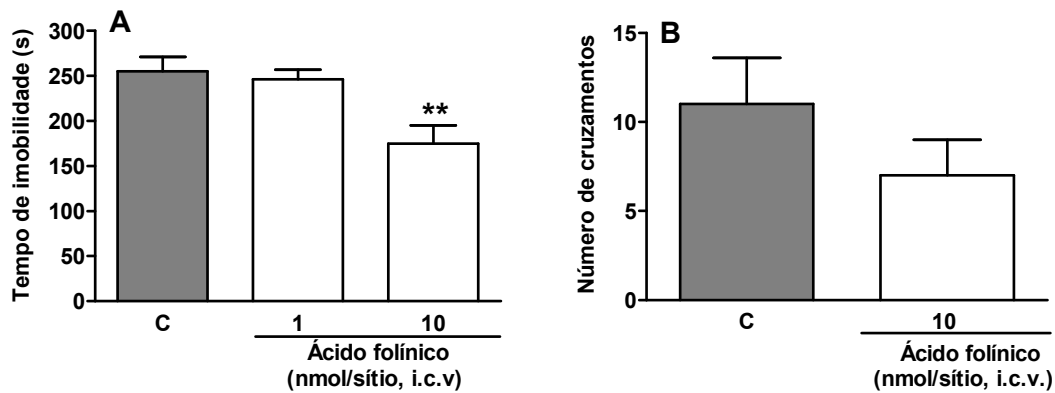


Figura 15. Efeito da administração aguda do ácido fólico por via i.c.v. no TNF (painel A) e na atividade locomotora (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 6-8$). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. A) tratamento ($F_{2,19} = 7,24$, $P < 0,01$). B) tratamento ($F_{1,10} = 1,42$, $P = 0,26$).

5.1.3. Efeitos do ácido fólico nos modelos animais de depressão induzida por estresse imprevisível (EI)

Os resultados ilustrados na Figura 16 mostram o efeito do tratamento durante 7 dias com ácido fólico (10 e 100 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em camundongos submetidos a 14 dias de estresse imprevisível e testados subsequentemente no TSC. O tratamento com ácido fólico nas duas doses utilizadas ou fluoxetina foi capaz de prevenir o aumento do tempo de imobilidade ocasionado pelo EI no TSC.

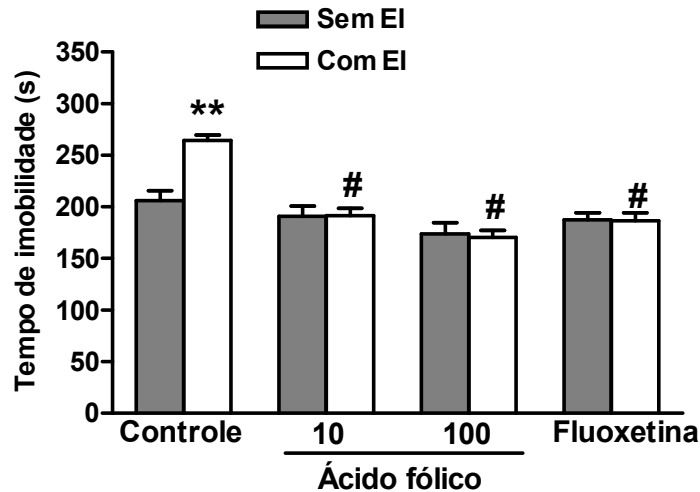


Figura 16. Efeito da administração de ácido fólico (10 e 100 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no TSC em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido por EI. Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 5-6$). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle e # $P < 0,01$ quando comparado com grupo controle com estresse. Pré-tratamento ($F_{3,38} = 21,31$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{1,38} = 5,35$, $P < 0,05$), interação ($F_{3,38} = 6,38$, $P < 0,01$)

Os resultados ilustrados na Figura 17 mostram o efeito do tratamento dos camundongos tratados durante 30 dias com homocisteína (200 mg/kg, p.o.) submetidos ao “splash teste” (Figura 17A e B) e ao TSC (Figura 17C). Os animais tratados com homocisteína apresentaram uma maior latência para o início e um menor tempo de permanência no comportamento de auto-limpeza no splash test quando comparados com o grupo controle. Estes animais apresentaram também um aumento significativo do tempo de imobilidade no TSC, quando comparados com o grupo controle.

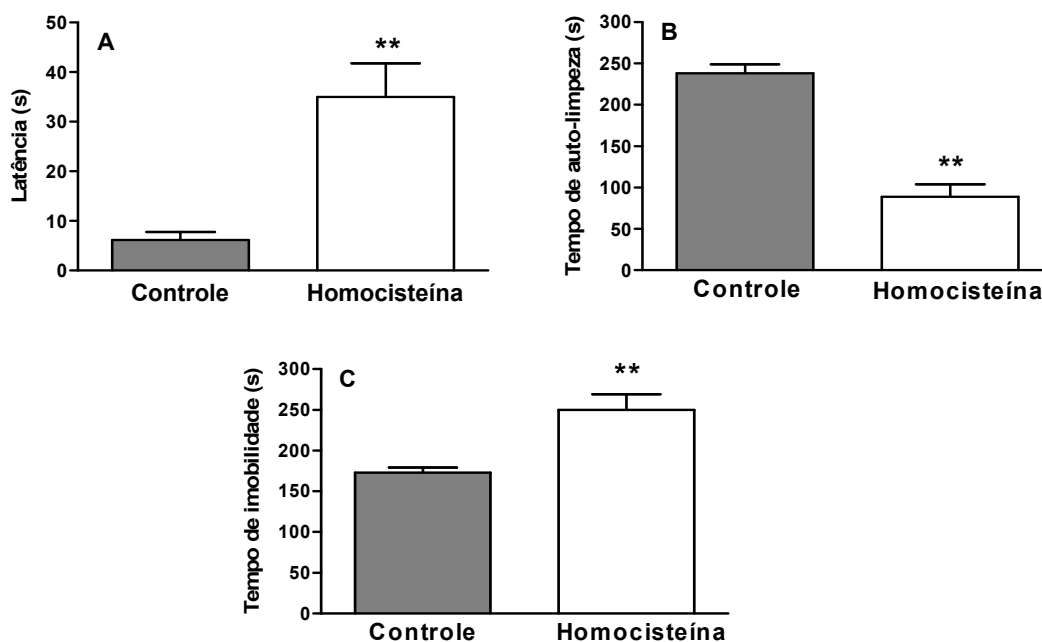


Figura 17. Efeitos do tratamento com homocisteína (200 mg/kg, p.o.) durante 30 dias no splash teste (painel A e B) e no TSC (painel C). Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 6-7$). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. A) tratamento ($F_{1,11} = 16,31$, $P < 0,01$). B) tratamento ($F_{1,12} = 64,13$, $P < 0,01$). C) tratamento ($F_{1,10} = 14,03$, $P < 0,01$).

5.2. Investigação dos sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização celular envolvidos na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF

5.2.1. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF em camundongos

O efeito do pré-tratamento dos camundongos com PCPA (100 mg/kg, um inibidor da síntese de serotonina) ou salina, uma vez ao dia por 4 dias consecutivos, no efeito antidepressivo do ácido fólico e da fluoxetina (controle positivo) é mostrado na Figura 18A.

O pré-tratamento dos camundongos com PCPA bloqueou a diminuição do tempo de imobilidade causado pelo ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (20 mg/kg, p.o.).

Figura 18B mostra o efeito sinérgico da co-administração de doses sub-ativas de ácido fólico (10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TNF.

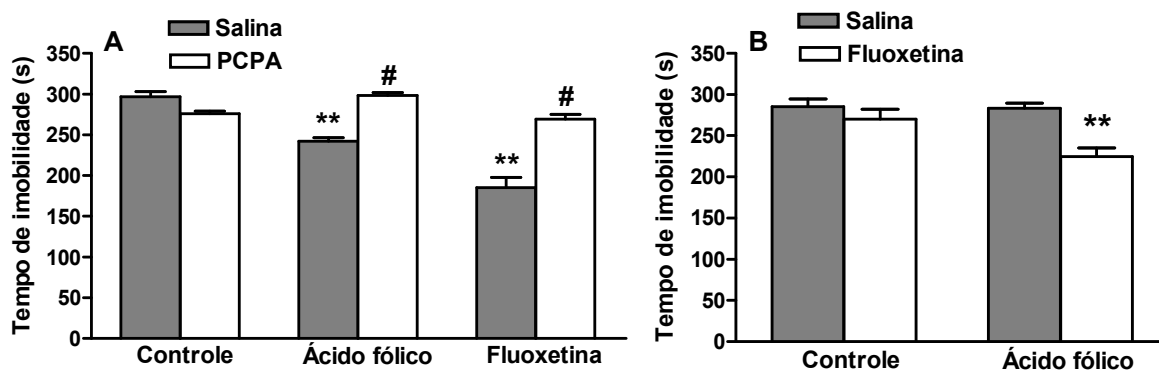


Figura 18. Efeito do pré-tratamento com um inibidor da síntese de serotonina, PCPA (100 mg/kg, durante 4 dias consecutivos), na redução do tempo de imobilidade do ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (20 mg/kg, p.o.) no TNF (A). Efeito da co-administração de ácido fólico (10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TNF (B). Os valores são expressos como média + E.P.M. ($n = 6-7$). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle; # $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina. A) pré-tratamento ($F_{1,32} = 47,92$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{2,32} = 37,55$, $P < 0,01$) e interação ($F_{2,32} = 28,90$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,24} = 13,93$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{1,24} = 5,73$, $P < 0,05$), e interação ($F_{1,24} = 4,86$, $P < 0,05$).

Figura 19A mostra que o pré-tratamento dos camundongos com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., um antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}) significativamente bloqueou a redução no tempo de imobilidade ocasionado pelo tratamento com ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) no TNF. Os resultados descritos na Figura 19B mostram o efeito sinérgico do pré-tratamento dos camundongos com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.) com uma dose sub-ativa de ácido fólico (10 mg/kg, p.o.) no TNF.

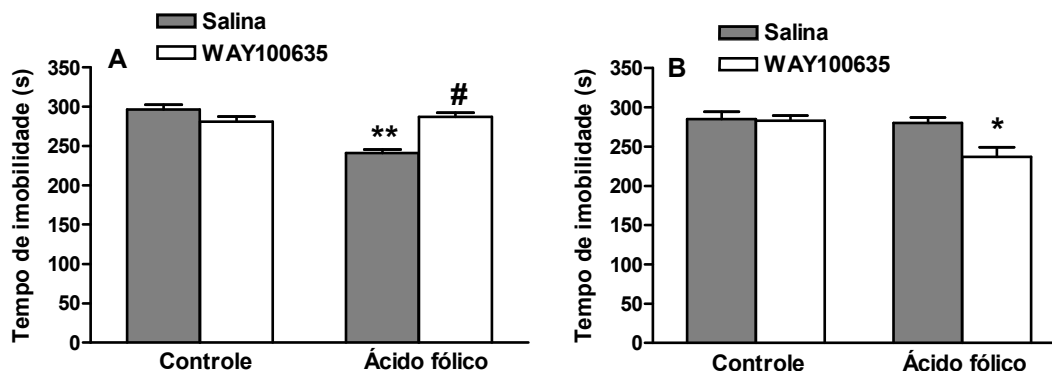


Figura 19. A) Inibição do efeito anti-imobilidade do ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) no TNF pelo pré-tratamento com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}). **B)** Influência do pré-tratamento dos camundongos com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.) no efeito de uma dose sub-ativa do ácido fólico (10 mg/kg, p.o.) no TNF. Os valores estão expressos com média + E.P.M. (n = 6-7). ***P* < 0,01 quando comparado com o grupo controle (salina); #*P* < 0,01 quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina. A) pré-tratamento ($F_{1,20} = 7,15$, $P = 0,05$), tratamento ($F_{1,20} = 18,66$, $P < 0,01$) e interação ($F_{1,20} = 29,88$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,23} = 7,63$, $P < 0,05$), tratamento ($F_{1,23} = 6,21$, $P < 0,05$) e interação ($F_{1,23} = 5,24$, $P < 0,05$).

Figura 20 mostra o efeito do pré-tratamento dos camundongos com cetanserina (5 mg/kg, um antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) na redução do tempo de imobilidade ocasionado pelo tratamento com ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) no TNF. Houve uma reversão significativa do efeito do ácido fólico pelo pré-tratamento com cetanserina.

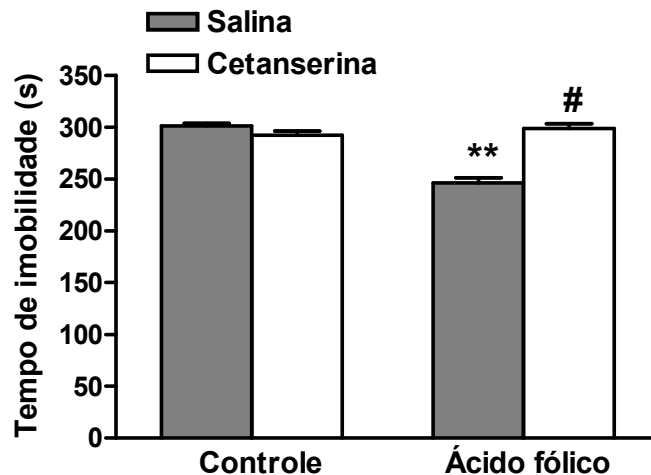


Figura 20. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com cetanserina (5 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) na redução do tempo de imobilidade ocasionado pelo tratamento com ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) no TNF. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-7). ***P* < 0,01 quando comparado com o grupo controle (salina); #*P* < 0,01 quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina. Pré-tratamento (F1,20= 27,55, *P* < 0,01), tratamento (F1,20= 33,73, *P* < 0,01) e interação (F1,20 = 53,06, *P* < 0,01).

5.2.2. Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do ácido fólico no TNF em camundongos

Os resultados descritos na Figura 21A-B mostram que o pré-tratamento dos camundongos com prazosin (1 mg/kg, i.p., um antagonista de α_1 -adrenoceptores) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., um antagonista de α_2 -adrenoceptores) foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) no TNF.

Resultados semelhantes aos obtidos nos itens 5.2.1 e 5.2.2 foram também obtidos utilizando os mesmos protocolos experimentais quando o ácido fólico foi administrado por via i.c.v. aos camundongos (dados não mostrados).

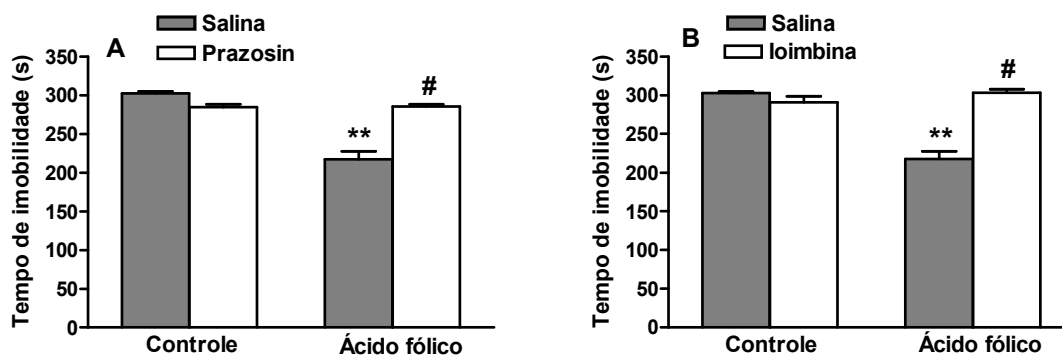


Figura 21. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com prazosin (1 mg/kg, i.p., painel A) ou com ioimbina (1 mg/kg, i.p., painel B) na redução do tempo de imobilidade ocasionado pelo tratamento com ácido fólico (50 mg/kg, p.o.) no TNF. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina. A) pré-tratamento ($F_{1,20} = 17,92$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{1,20} = 50,56$, $P < 0,01$), e interação ($F_{1,20} = 52,58$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,20} = 28,26$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{1,20} = 27,37$, $P < 0,01$), e interação ($F_{1,20} = 48,65$, $P < 0,01$).

5.2.3. Envolvimento dos receptores NMDA e da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF

A Figura 22A mostra que o pré-tratamento dos camundongos com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.) reverteu o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF. A Figura 22B mostra o efeito antidepressivo sinérgico de doses sub-ativas de ácido fólico e MK-801 no TNF.

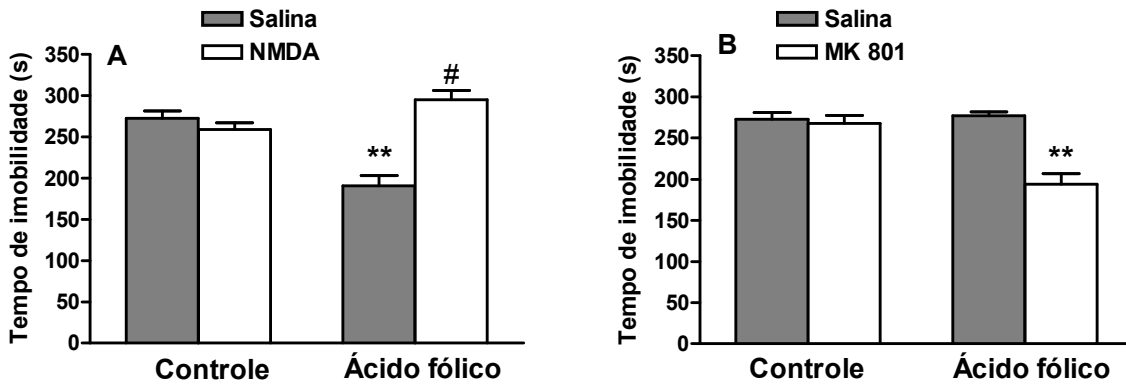


Figura 22. A) Efeito do pré-tratamento dos camundongos com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.) no efeito antidepressivo do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.). B) Efeito do pré-tratamento dos animais com MK-801 (0,001 mg/kg, s.c.) no efeito de uma dose sub-ativa de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n =5- 6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina. A) pré-tratamento ($F_{1,22} = 18,04$, $P < 0,01$); tratamento ($F_{1,22} = 4,57$, $P < 0,05$); interação ($F_{1,22} = 30,60$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,17} = 14,30$, $P < 0,01$); tratamento ($F_{1,17} = 17,59$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,17} = 18,88$, $P < 0,01$).

Os resultados descritos na Figura 23 mostram que o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF foi revertido pelos pré-tratamentos dos animais com L-arginina (750 mg/kg, i.p., um precursor de NO, painel A) e com SNAP (25 µg/sítio, i.c.v., um doador de NO, painel B).

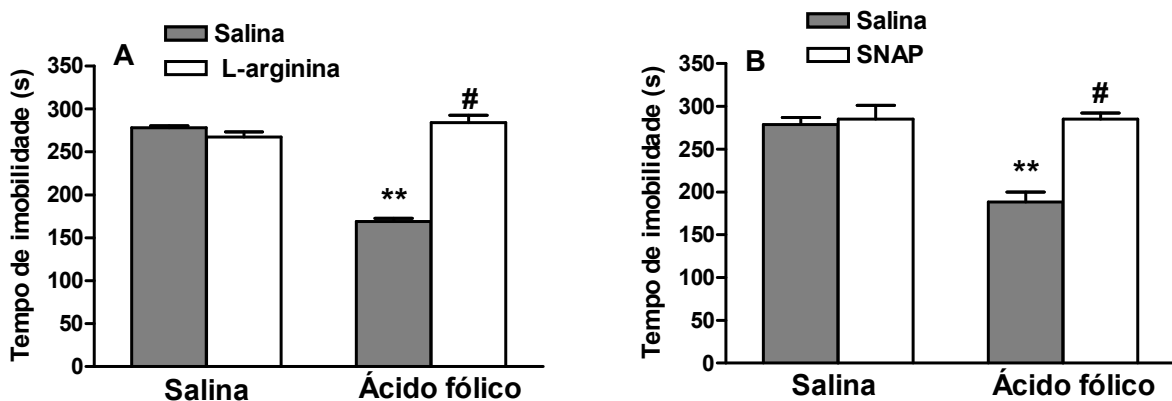


Figura 23. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com L-arginina (750 mg/kg, i.p, painel A) ou SNAP (25 µg/sítio, i.c.v., painel B) no efeito anti-imobilidade do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina. A) pré-tratamento ($F_{1,20} = 83,53$, $P < 0,01$); tratamento ($F_{1,20} = 64,53$, $P < 0,01$), interação ($F_{1,20} = 121,05$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,20} = 20,62$, $P < 0,01$); tratamento ($F_{1,20} = 15,88$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,20} = 15,54$, $P < 0,01$).

Os resultados ilustrados na Figura 24 mostram que o pré-tratamento dos camundongos com 7-nitroindazol (25 mg/kg i.p., um inibidor específico da NOS neuronal, painel A) aumentou o efeito antidepressivo de uma dose sub-ativa de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. A Figura 24B mostra que a administração de 7-nitroindazol *per se* ou em combinação com ácido fólico não afetou a atividade locomotora no campo aberto.

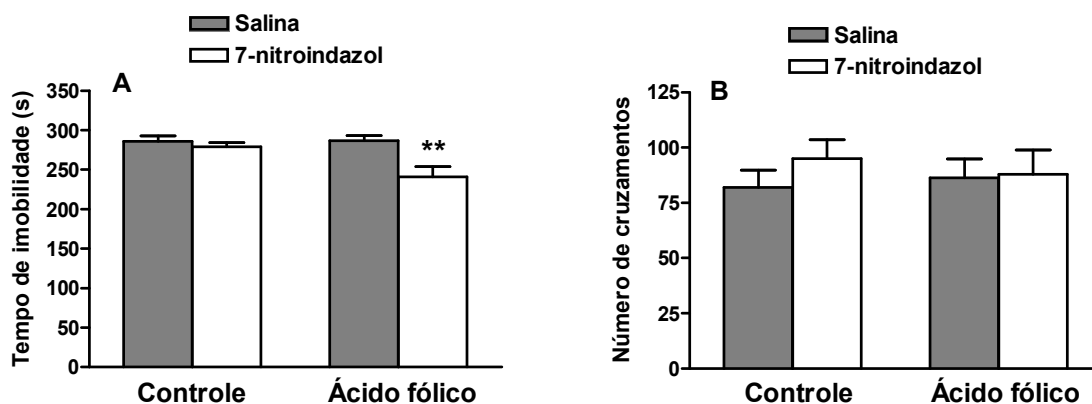


Figura 24. Efeito do pré-tratamento com 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p.) em potencializar o efeito tipo-antidepressivo do ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF (painel A), sem causar nenhuma alteração na atividade locomotora no campo aberto (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5-6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina). A) pré-tratamento ($F_{1,20} = 9,94$, $P < 0,01$); tratamento ($F_{1,20} = 4,79$, $P < 0,05$); interação ($F_{1,20} = 5,41$, $P < 0,05$). B) pré-tratamento ($F_{1,19} = 0,72$, $P = 0,41$); tratamento ($F_{1,19} = 0,10$, $P = 0,92$); interação ($F_{1,19} = 0,44$, $P = 0,51$).

A Figura 25A mostra o efeito do pré-tratamento dos camundongos com azul de metileno (10 e 20 mg/kg i.p., um inibidor da NOS e da GCs) e de uma dose sub-ativa de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) sobre o tempo de imobilidade no TNF. O azul de metileno administrado na dose de 20 mg/kg, i.p. foi capaz de produzir um efeito antidepressivo sinérgico com o ácido fólico. Figura 25B mostra que a administração de azul de metileno (20 mg/kg i.p.) *per se* ou em combinação com ácido fólico não afetou a locomoção dos animais avaliados no campo aberto.

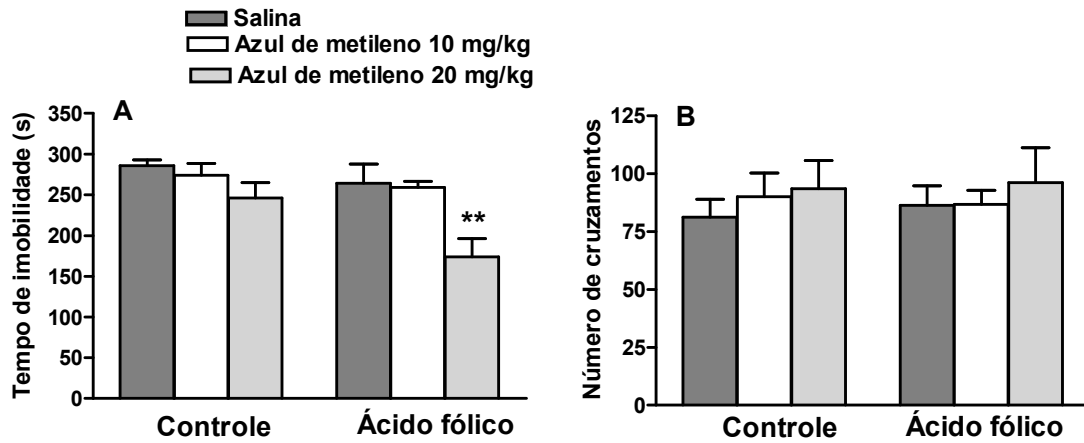


Figura 25. Efeito do pré-tratamento com azul de metileno (10-20 mg/kg, i.p.) no efeito do ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF (painel A), sem causar alteração locomotora em animais testados no campo aberto (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5-6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina). A) pré-tratamento ($F_{2,30} = 7,34$, $P < 0,01$); tratamento ($F_{1,30} = 4,35$, $P < 0,05$); interação ($F_{2,30} = 5,41$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{2,30} = 0,38$, $P = 0,69$); tratamento ($F_{1,30} = 0,49$, $P = 0,49$); interação ($F_{2,30} = 0,041$, $P = 0,96$).

A Figura 26 mostra que o pré-tratamento dos animais com sildenafil (5 mg/kg, i.p., um inibidor da fosfodiesterase 5) foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF.

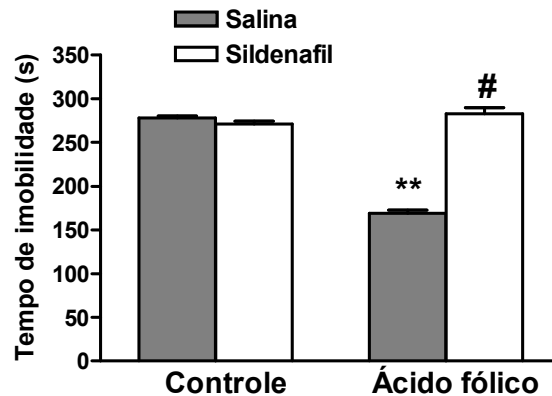


Figura 26. Efeito do pré-tratamento dos animais com sildenafil (5 mg/kg, i.p.). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5-6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina). # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo tratado com ácido fólico e pré-tratado com salina. Pré-tratamento ($F_{1,20} = 142,08$, $P < 0,01$); tratamento ($F_{1,20} = 117,49$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,20} = 181,69$, $P < 0,01$).

5.2.4. Envolvimento do sistema opióide na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF

Figura 27A mostra que o pré-tratamento dos camundongos com naloxona (1 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo de receptores opióides) significativamente preveniu o efeito antidepressivo do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Os resultados da Figura 27B mostram que o pré-tratamento dos animais com naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c., um antagonista não seletivo de receptores opióides que não atravessa a barreira hematoencefálica) não preveniu o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF.

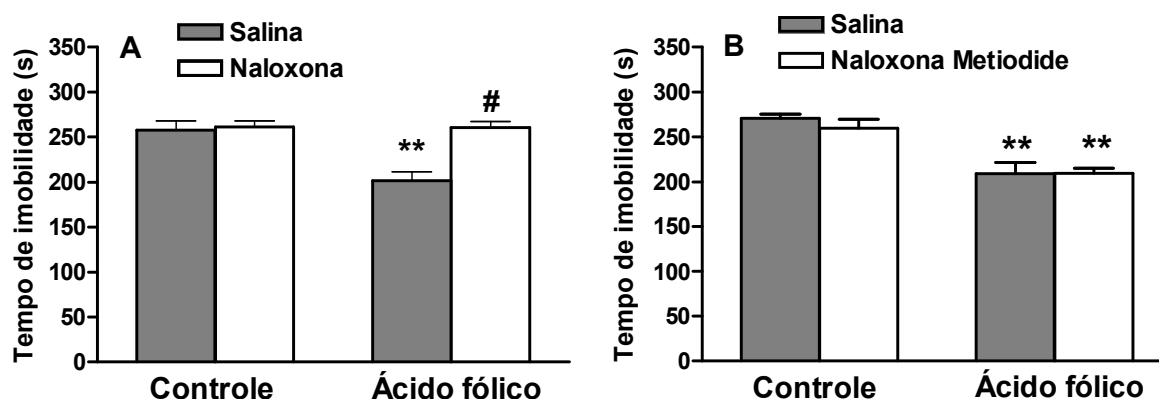


Figura 27. Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p., painel A) ou naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c.) no efeito anti-imobilidade do ácido fólico no TNF. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5-7). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina). A) pré-tratamento ($F_{1,21}=12,46$, $P < 0,05$); tratamento ($F_{1,21}=10,31$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,21}=9,60$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,20}=0,32$, $P = 0,58$); tratamento ($F_{1,20} = 36,63$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,20} = 0,36$, $P = 0,55$).

A Figura 28A mostra o efeito da morfina (1 mg/kg, s.c., um agonista não-seletivo de receptores opióides) em potencializar a ação de uma dose sub-ativa de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. A Fig. 28B mostra que a morfina sozinha ou em combinação com ácido fólico não causou nenhuma alteração na atividade locomotora no campo aberto.

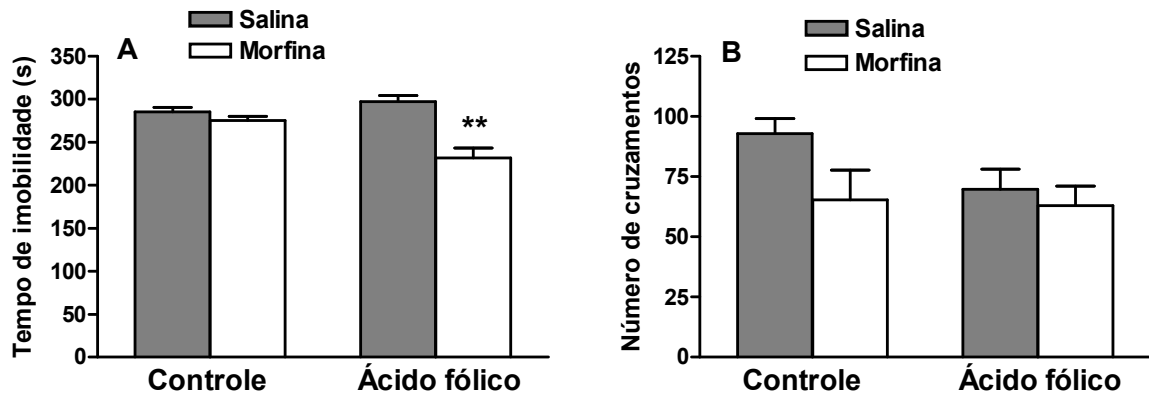


Figura 28. Efeito da morfina (1 mg/kg, s.c.) em potencializar a ação de uma dose sub-ativa de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF (painel A), sem causar nenhuma alteração locomotora no campo aberto (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina). A) pré-tratamento ($F_{1,20} = 4,12$, $P < 0,05$); tratamento ($F_{1,20} = 23,88$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,20} = 12,49$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,20} = 1,99$, $P = 0,17$); tratamento ($F_{1,20} = 3,56$, $P = 0,07$); interação ($F_{1,20} = 1,36$, $P = 0,26$).

Os resultados descritos nas Figuras 29A e 29B mostram que o pré-tratamento dos animais com naltrindol (3 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores δ -opióides), ou naloxonazina (10 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores μ_1 -opióides) significativamente preveniu o efeito antidepressivo do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF.

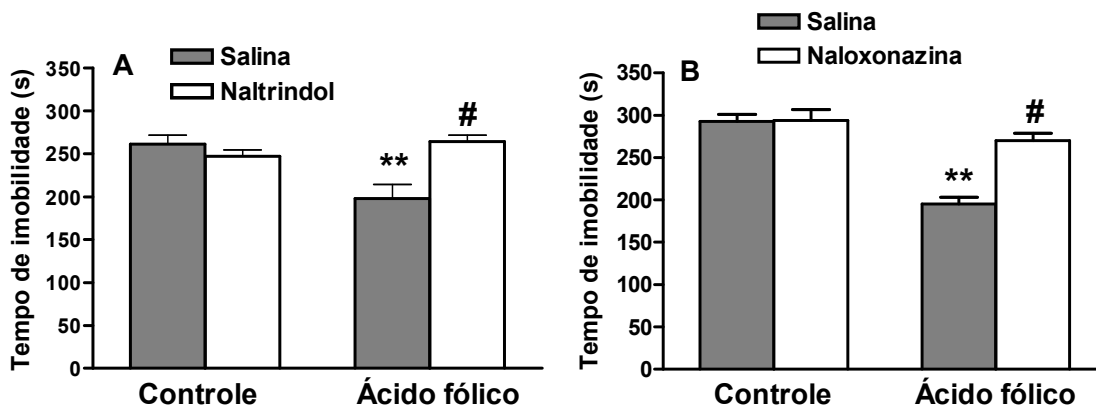


Figura 29. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com naltrindol (3 mg/kg, i.p., painel A) ou naloxonazina (10 mg/kg, i.p., painel B) no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=6-7). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina) e # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo ácido fólico pré-tratado com salina. A) pré-tratamento ($F_{1,21}=5,67$, $P < 0,05$), tratamento ($F_{1,21}=4,38$, $P < 0,05$); interação ($F_{1,21}=13,17$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{1,20}=39,62$, $P < 0,01$) tratamento ($F_{1,20}=15,74$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,20}=14,79$, $P < 0,01$).

A Figura 30A mostra que o pré-tratamento dos camundongos com naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter a redução do tempo de imobilidade causado pela combinação de doses sub-ativas de ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) e MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) no TNF. Os resultados descritos na Figura 30B mostram que o pré-tratamento dos animais com naloxona, ácido fólico, MK-801 ou com estas drogas em combinação não causou nenhuma alteração na atividade locomotora avaliada no campo aberto.

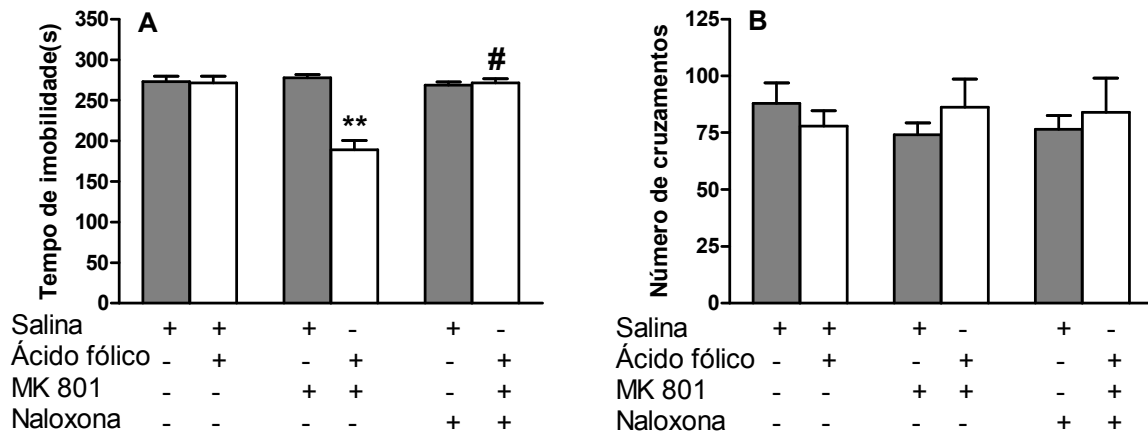


Figura 30. Efeitos da naloxona (1 mg/kg, i.p.) na reversão do efeito antidepressivo sinérgico do MK-801 (0,001 mg/kg, s.c.) com ácido fólico (1 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF (painel A), sem causar alteração locomotora no campo aberto (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5-7). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina) e # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo ácido fólico + MK 801. A) pré-tratamento ($F_{2,31}=17,58$, $P < 0,01$) tratamento ($F_{1,31}=22,89$, $P < 0,01$); interação ($F_{2,31}=24,59$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{2,29}=0,05$, $P = 0,95$); tratamento ($F_{1,29}=0,16$, $P = 0,69$); interação ($F_{2,29}=0,77$, $P = 0,47$).

5.2.5. Envolvimento de vias de sinalização celular na ação antidepressiva do ácido fólico

A Figura 31 mostra a influência do pré-tratamento de camundongos com o inibidor específico da PKA, o composto H-89 (1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) na redução do tempo de imobilidade ocasionado pelo ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Este composto foi capaz de prevenir o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF.

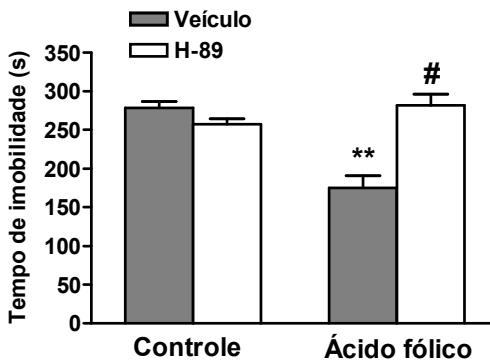


Figura 31. Efeito do pré-tratamento de camundongos com H-89 (1 µg/sítio, i.c.v.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com H-89 e depois de 15 minutos tratados com ácido fólico. O TNF foi realizado 15 minutos após o tratamento com ácido fólico. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=6-8). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (salina) e # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo ácido fólico pré-tratado com salina. Pré-tratamento ($F_{1,22}=14,15$, $P < 0,01$) tratamento ($F_{1,24}=11,94$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,24}=31,34$, $P < 0,01$).

Na Figura 32 está representada a influência do pré-tratamento de camundongos com um inibidor da via MAPK/ERK, o PD98059 (5 µg/sítio, i.c.v.) no efeito antidepressivo provocado pelo ácido fólico no TNF. Este composto não foi capaz de reverter o efeito do ácido fólico no TNF.

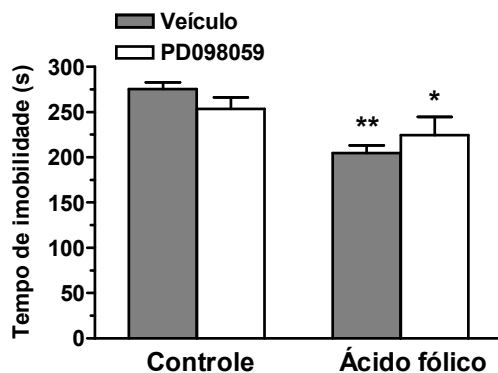


Figura 32. Efeito do pré-tratamento de camundongos com PD98059 (5 µg/sítio, i.c.v.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com PD98059 e depois de 15 minutos tratados com ácido fólico. O TNF foi realizado 15 minutos após o tratamento com ácido fólico. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-8). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, quando comparado com o grupo controle. Pré-tratamento ($F_{1,24}=0,004$, $P = 0,951$) tratamento ($F_{1,24} = 12,34$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,24}=2,15$, $P = 0,15$).

Na Figura 33 pode ser observado o resultado do pré-tratamento dos camundongos com um inibidor específico da cálcio/calmodulina cinase II (CaMKII), o KN-62 (1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito antidepressivo causado pelo ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Este inibidor foi capaz de reverter o efeito do ácido fólico no TNF.

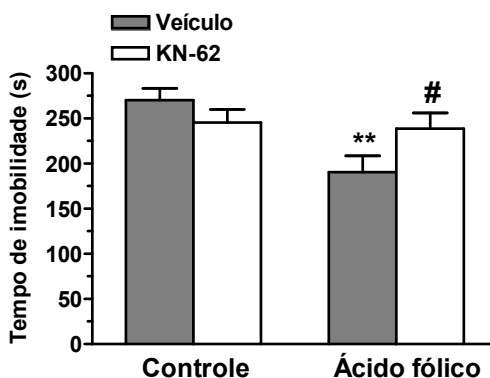


Figura 33. Efeito do pré-tratamento de camundongos com KN-62 (1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito antidepressivo do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com KN-62 e depois de 15 minutos receberam ácido fólico. O TNF foi realizado 15 minutos após o tratamento com ácido fólico. Os resultados estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-8). ** $P < 0,01$, quando comparado com o grupo controle, # $P < 0,01$, quando comparado com o grupo tratado somente com ácido fólico. Pré-tratamento ($F_{1,20} = 0,53$, $P = 0,47$) tratamento ($F_{1,20} = 7,39$, $P < 0,05$); interação ($F_{1,20} = 5,24$, $P = 0,05$).

Na Figura 34 está representado o efeito do pré-tratamento de camundongos com um inibidor específico da proteína cinase C (PKC), a queleritrina (1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito antidepressivo do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. A queleritrina não reverteu o efeito anti-imobilidade do ácido fólico.

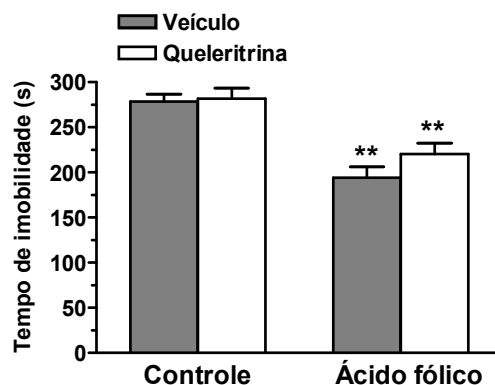


Figura 34. Efeito do pré-tratamento de camundongos com quelitrina (1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito antidepressivo do ácido fólico (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com quelitrina e depois de 15 minutos tratados com ácido fólico. O TNF foi realizado 15 minutos após o tratamento com ácido fólico. Os resultados estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-8). ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. Pré-tratamento ($F_{1,24} = 1,60$, $P = 0,21$) tratamento ($F_{1,24} = 39,35$, $P < 0,01$); interação ($F_{1,24}=0,98$, $P = 0,33$).

5.3. Efeitos do ácido fólico em um modelo de mania induzido por ouabaína em ratos

O efeito do pré-tratamento dos ratos com ácido fólico (10-100 mg/kg, p.o.), cloreto de lítio (LiCl, 45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos, no efeito hiperlocomotor causado pela ouabaína (50 pmol/sítio) é mostrada na Figura 35. O pré-tratamento dos ratos com ácido fólico (50 e 100 mg/kg) e LiCl bloqueou o aumento da atividade locomotora ocasionado pelo tratamento com ouabaína.

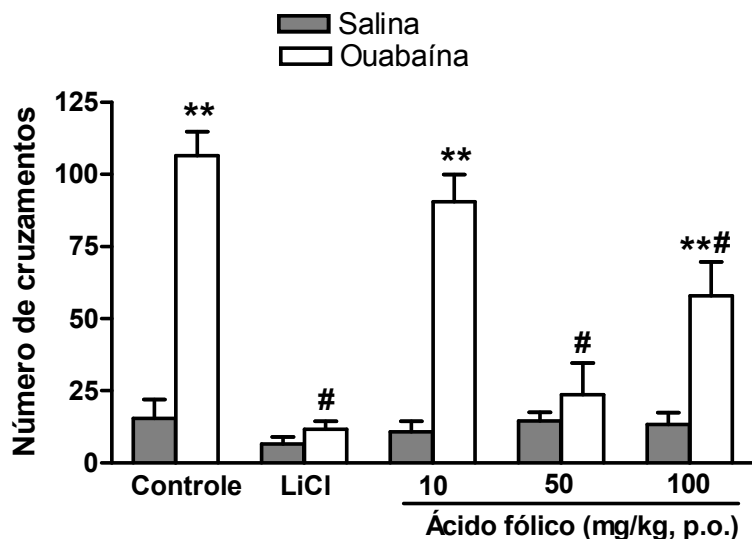


Figura 35. Efeito do pré-tratamento dos ratos com ácido fólico (10-100 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos, no efeito hiperlocomotor ocasionado pela ouabaína (50 pmol/sítio). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 5-6). ** $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina; # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo pré-tratado com água e tratado com ouabaína. Pré-tratamento ($F_{4,49} = 20,59$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{1,49} = 108,13$, $P < 0,01$) e interação ($F_{4,49} = 17,26$, $P < 0,01$).

A Figura 36 mostra um significativo aumento nos níveis de TBARS em córtex cerebral e hipocampo de ratos tratados com ouabaína. O pré-tratamento dos ratos com LiCl (45 mg/kg) e ácido fólico nas doses de 10-100 mg/kg e 10-50 mg/kg preveniu o aumento nos níveis de TBARS ocasionado pelo tratamento com ouabaína em córtex cerebral (Figura 36A) e hipocampo (Figura 36B), respectivamente.

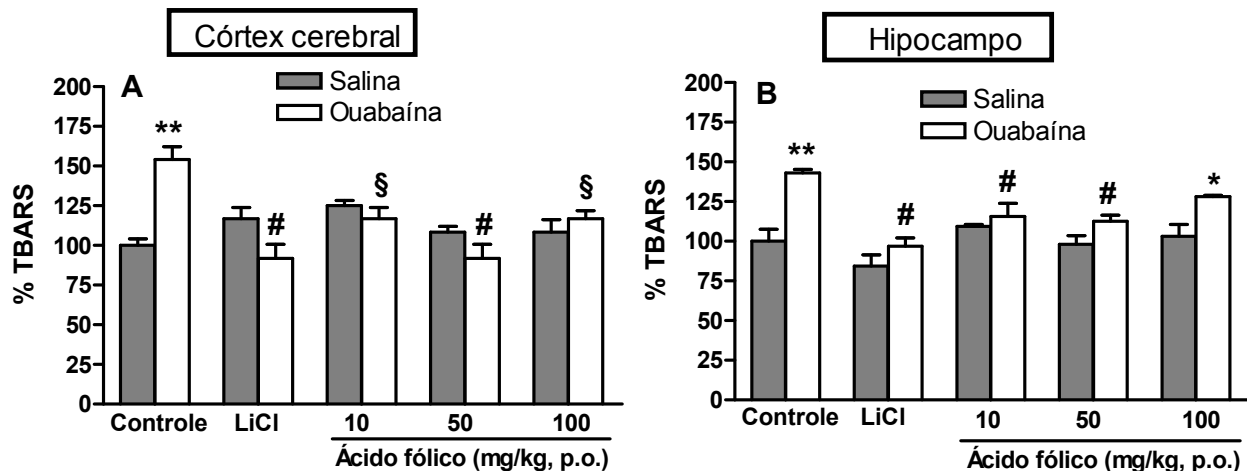


Figura 36. Efeito do pré-tratamento dos ratos com ácido fólico (10-100 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes por dia durante 7 dias consecutivos, no aumento nos níveis de TBARS em córtex cerebral (painel A) e em hipocampo (painel B) induzido pelo tratamento com ouabaína (50 pmol/sítio). Os dados estão representados como % do controle e estão expressos como média + E.P.M. (n = 5-6). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina; § $P < 0,05$ e # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo ouabaína pré-tratado com água. A) pré-tratamento ($F_{4,45} = 3,61$, $P < 0,05$), tratamento ($F_{1,45} = 0,34$, $P = 0,56$) e interação ($F_{4,45} = 7,44$, $P < 0,01$). B) pré-tratamento ($F_{4,41} = 8,51$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{1,41} = 29,47$, $P < 0,01$) e interação ($F_{4,41} = 3,55$, $P < 0,05$).

A Figura 37 mostra o efeito do tratamento dos ratos com ouabaína na atividade das enzimas antioxidante GPx em córtex cerebral e hipocampo. Uma significativa redução na atividade da GPx foi encontrada em hipocampo de ratos tratados com ouabaína, porém, o pré-tratamento dos animais com ácido fólico (10-100 mg/kg) e LiCl (45 mg/kg) preveniu esta redução (Figura 37 B). Nenhuma mudança foi observada na atividade da GPx no córtex cerebral de ratos tratados com ouabaína (Figura 37A).

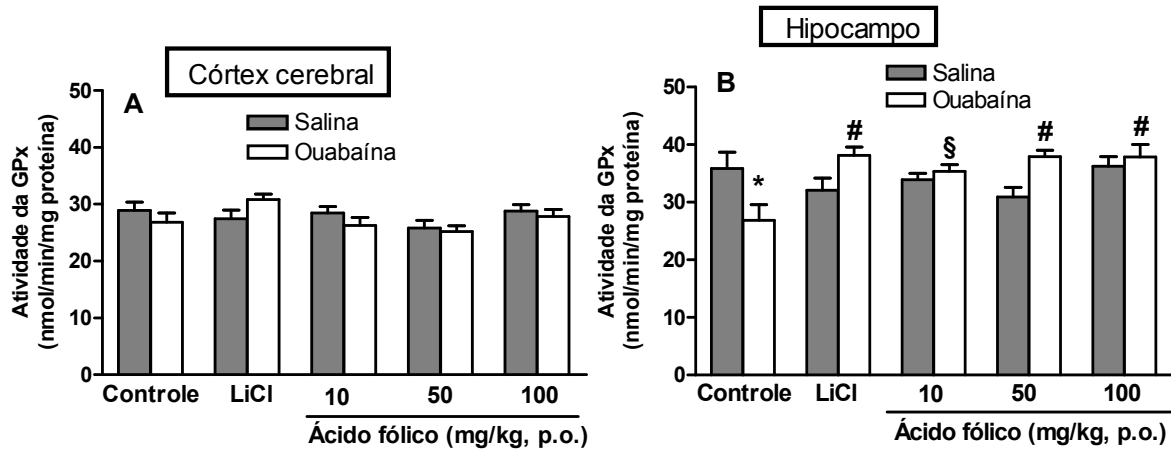


Figura 37. Atividade da enzima GPx em córtex cerebral (A) e em hipocampo (B) de ratos pré-tratados com ácido fólico (10-100 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia por 7 dias consecutivos, e tratados agudamente com ouabaína (50 pmol/sítio). A atividade enzimática é expressa por nmol/min/mg proteína. Os valores estão expressos como média + E.P.M., n = 5-6. * $P < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo tratado com salina; § $P < 0,05$ e # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo pré-tratado com água e tratado com ouabaína. B) pré-tratamento ($F_{4,42} = 2,34$, $P = 0,07$), tratamento ($F_{1,42} = 1,44$, $P = 0,24$) e interação ($F_{4,42} = 5,82$, $P < 0,01$).

O tratamento com ouabaína causou diminuição na atividade da GR em córtex cerebral (Figura 38A) e hipocampo (Figura 38B). A prevenção da diminuição na atividade da GR ocorreu nos grupos pré-tratados com ácido fólico (10-100 mg/kg) e LiCl (45 mg/kg) em córtex cerebral e nas doses de 10-50 mg/kg de ácido fólico em hipocampo de ratos tratados com ouabaína.

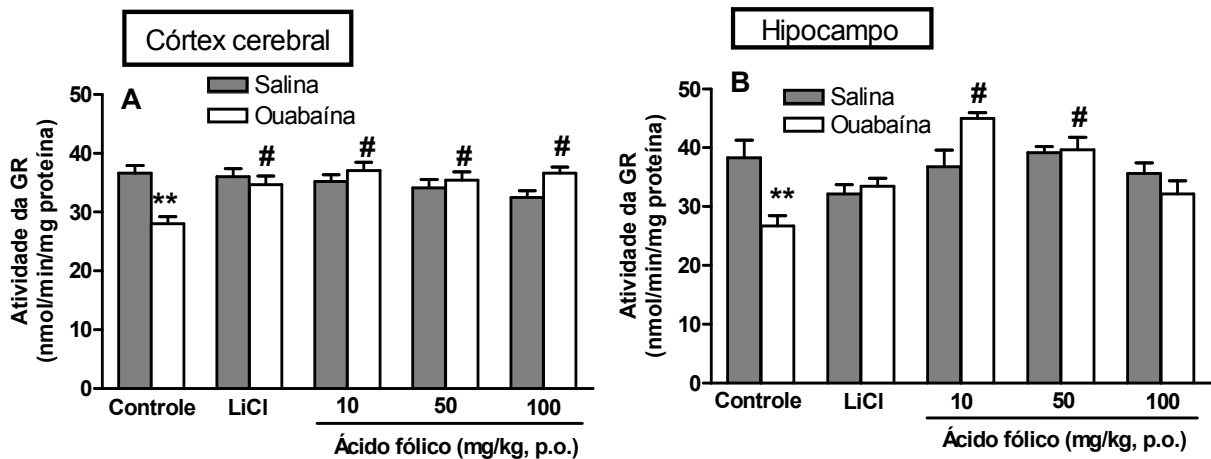


Figura 38. Atividade da enzima GR em córtex cerebral (A) e em hipocampo (B) de ratos pré-tratados com ácido fólico (10-100 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia por 7 dias consecutivos, e tratados agudamente com ouabaína (50 pmol/sítio). A atividade enzimática é expressa por nmol/min/mg proteína. Os valores estão expressos como média + E.P.M., $n = 5-6$. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo grupo tratado com salina; # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo pré-tratado com água e tratado com ouabaína. C) pré-tratamento ($F_{4,49} = 2,28$, $P = 0,07$), tratamento ($F_{1,49} = 0,43$, $P = 0,52$) e interação ($F_{4,49} = 6,89$, $P < 0,01$). D) pré-tratamento ($F_{4,41} = 8,06$, $P < 0,01$), tratamento ($F_{1,41} = 0,68$, $P = 0,41$) e interação ($F_{4,41} = 6,79$, $P < 0,01$).

6. Discussão

Os transtornos de humor que incluem a depressão unipolar e o transtorno bipolar são os transtornos psiquiátricos mais prevalentes e comprometem as funções fisiológicas, o humor e a cognição. A evolução dos transtornos de humor é flutuante, possuindo, em geral, uma característica de intervalos mais longos entre os episódios iniciais, com intervalos menores posteriores à medida que a doença progride. Os fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos de humor incluem a vulnerabilidade genética e os estressores psicossociais globais, que podem deflagrar conjuntamente a ocorrência de episódios completos (Machado-Vieira e Soares, 2007).

Considerando a indicação através de estudos clínicos de que o ácido fólico pode estar envolvido na fisiopatologia dos transtornos de humor este estudo investigou os efeitos desta vitamina em modelos animais de depressão e de mania e seus mecanismos de ação.

Os resultados do presente estudo demonstram que a administração de ácido fólico produz efeito antidepressivo em modelos animais de depressão (TNF, TSC, EI e splash test) em camundongos. Este efeito antidepressivo do ácido fólico parece envolver os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, glutamatérgico, opioidérgico, a via L-arginina-NO-GMPc e as cascatas de sinalização celular que envolvem a PKA e a CAMKII. Além disso, este estudo demonstra que o ácido fólico possui efeito antimaníaco, pois é capaz de prevenir a hiperlocomoção ocasionada por ouabaína em ratos. Este efeito antimaníaco do ácido fólico parece ser, ao menos em parte, devido a suas propriedades antioxidantes, uma vez que ele foi capaz de prevenir a lipoperoxidação (TBARS) e a diminuição das atividades das enzimas antioxidantes GPx e GR em córtex cerebral e hipocampo dos ratos submetidos ao modelo de mania induzida por ouabaína.

Neste trabalho demonstrou-se que a administração aguda de ácido fólico (p.o. e i.c.v.) e de ácido folínico (i.c.v.) produz um efeito antidepressivo no TNF e no TSC. Modelos com validade preditiva, o TNF e o TSC são amplamente utilizados para o estudo da depressão (para revisão ver: Nestler et al., 2002b; McArthur e Borsini, 2006). Para um modelo possuir validade preditiva fármacos que são utilizados na clínica no tratamento da doença devem ser hábeis em reverter às alterações comportamentais produzidas no modelo animal (para revisão ver Willner, 1984). O TNF foi descrito primeiramente por Porsolt et al. (1977), sendo utilizado em ratos e posteriormente em camundongos, enquanto o TSC foi descrito em camundongos por Steru et al. (1985). Estes dois modelos são amplamente utilizados na busca por compostos com possível ação antidepressiva (Bourin et al., 2005) por serem de fácil uso e de boa reprodutibilidade (para revisão ver Cryan et al., 2002). Além disso, eles são sensíveis a todas as classes de fármacos antidepressivos (para revisão ver: Nestler et al., 2002b; Cryan e Slattery, 2007). Como crítica a estes modelos, está o fato de eles serem sensíveis agudamente aos antidepressivos, enquanto que na clínica são necessárias algumas semanas para que ocorra a resposta terapêutica (para revisão ver Cryan et al., 2002).

O tratamento por via oral com ácido fólico durante 30 dias também produziu uma diminuição do tempo de imobilidade no TNF, o que indica que não há uma tolerância ao efeito do ácido fólico administrado cronicamente.

A redução do tempo de imobilidade ocasionada pelos tratamentos com o ácido fólico e ácido folínico (metabólito ativo do ácido fólico) no TNF e no TSC não pode ser atribuída a um efeito psicoestimulante destes compostos, uma vez que os tratamentos com ácido fólico e ácido folínico não causaram alteração locomotora nos animais testados na caixa de locomoção após habituação por 2 h à caixa. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos clínicos que mostram o envolvimento do ácido fólico na fisiopatologia da depressão (para revisão ver: Reynolds, 2002; Mattson e Shea, 2003; Coppen e Bolander-Gouaille, 2005; Bottiglieri, 2005).

Os modelos animais de estresse têm sido utilizados para mimetizar mudanças comportamentais similares à depressão humana (Ducottet et al., 2003; Lu et al., 2006). Nestes modelos, os animais são expostos a diversos fatores estressantes e, como resultados apresentam comportamentos tipo-depressivo (McArthur e Borsini, 2006), tais como alterações de peso corporal, diminuição do consumo de sacarose (medida de anedonia) e na frequência de limpeza corporal (Yalcin et al., 2005; Casarotto e Andreatini, 2007). Alguns antidepressivos atenuam as mudanças comportamentais induzidas pelo estresse (McArthur e Borsini, 2006). Entre estes modelos, encontram-se o modelo do estresse imprevisível (Lu et al., 2006).

Sabendo que o estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo à depressão e que em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial (Post, 1992). Neste estudo foram avaliados os efeitos dos tratamentos com ácido fólico e fluoxetina (controle positivo) sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pelo modelo de estresse imprevisível (EI) no TSC. Os resultados mostraram que os animais submetidos ao EI apresentam um comportamento tipo-depressivo no TSC e que os tratamentos com ácido fólico ou fluoxetina (controle positivo) foram capazes de prevenir este efeito no TSC. Resultado similar foi reportado por Mineur e colaboradores (2007) aonde a exposição dos animais ao modelo de estresse crônico moderado ocasionou aumento do tempo de imobilidade no TSC. Este resultado corrobora a hipótese que o ácido fólico pode ser um efetivo agente antidepressivo.

O tratamento dos camundongos durante 30 dias com homocisteína (200 mg/kg, p.o.) causou um comportamento tipo-depressivo no “splash test” e no TSC. Este resultado está de acordo com a hipótese homocisteínica da depressão (para revisão ver Folstein et al., 2007), a qual postula que fatores ambientais e genéticos que elevam os níveis de homocisteína podem

causar doença vascular cerebral e/ou alterações nos neurotransmissores, levando à depressão. O aumento nos níveis de homocisteína tem sido associado com várias doenças neurológicas incluindo a depressão (Perry et al., 1995; Kruman et al., 2002; para revisão ver Bottiglieri, 2005). Entretanto, o mecanismo molecular pelo qual a homocisteína induz neurotoxicidade não está bem estabelecido. Altos níveis de homocisteína podem ter vários efeitos neuropatológicos, incluindo acúmulo citosólico de Ca^{2+} , indução de estresse oxidativo, apoptose e excitocidade mediada por NMDA (Kim e Pae, 1996; Kruman et al., 2000; Ho et al., 2002; Maler et al., 2003). Estudos futuros serão necessários para caracterizar os mecanismos responsáveis pelo efeito tipo-depressivo decorrente da administração de homocisteína.

A depressão pode resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos. No entanto, a patogênese da depressão está intimamente relacionada com o sistema monoaminérgico, particularmente com os mecanismos noradrenérgicos e serotoninérgicos. A hipótese monoaminérgica sugere que a depressão é resultante de uma deficiência de serotonina (5-HT) ou noradrenalina ou de receptores ineficientes (Mann et al., 1996; para revisão ver: Wong e Licínio, 2001; Taylor et al., 2005). Alterações na função serotoninérgica por deficiência de ácido fólico têm sido relatadas e associadas com prejuízo no metabolismo de 5-HT (Botez et al., 1982; Gospe et al., 1995; para revisão ver Bottiglieri, 2005). O envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF foi investigado utilizando PCPA, um inibidor da síntese de 5-HT e antagonistas serotoninérgicos.

Estes resultados mostram que o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF é mediado, ao menos em parte, pelo aumento da concentração de 5-HT na fenda sináptica, uma vez que este efeito, assim como o da fluoxetina, foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento com PCPA. Corroborando com os estes resultados alguns trabalhos demonstraram que o pré-

tratamento dos animais com PCPA é capaz de bloquear o efeito antidepressivo da fluoxetina (Page et al., 1999; Eckeli et al., 2000; Zomkowski et al., 2004; Kaster et al., 2005). Já foi demonstrado que o PCPA atua pré-sinápticamente depletando o conteúdo de serotonina por inibir a enzima triptofano hidroxilase (Pini et al., 1996). Embora não tenha sido mensurada a concentração de serotonina após a administração de PCPA, estes resultados comportamentais juntamente com estudos da literatura (Eckeli et al., 2000; Zomkowski et al., 2004; Kaster et al., 2005) sugerem que o tratamento foi efetivo em depletar a 5-HT endógena. Em adição, sabe-se que a administração de PCPA por 4 dias consecutivos depleta em torno de 60% o estoque endógeno de 5-HT em camundongos, enquanto os níveis de noradrenalina e dopamina não são afetados (Redrobe et al., 1998). Considerando que o tratamento com PCPA foi capaz de prevenir o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF podemos concluir que o ácido fólico para ter seu efeito antidepressivo requer um sistema serotoninérgico pré-sináptico intacto.

Neste estudo mostrou-se também o efeito sinérgico de doses sub-ativas de ácido fólico e fluoxetina, administradas por via oral, em reduzir o tempo de imobilidade no TNF. Um resultado similar também foi obtido quando o ácido fólico e a fluoxetina foram administradas por via i.c.v. (dados não mostrados). Este achado está de acordo com um estudo clínico aonde a suplementação com ácido fólico foi capaz de aumentar o efeito antidepressivo da fluoxetina (Coppen e Bailey, 2000). Além disso, a deficiência de folato está associada a uma pobre resposta ao tratamento da depressão com os inibidores da recaptação de 5-HT (Alpert et al., 2002). Uma possível explicação para o efeito sinérgico do ácido fólico e fluoxetina no TNF é que estes compartilham do mesmo mecanismo de ação, ou seja, o ácido fólico similarmente a fluoxetina aumentaria os níveis de 5-HT na fenda sináptica.

A participação de subtipos de receptores de 5-HT no efeito antidepressivo do ácido fólico também foi objeto de estudo neste trabalho. Os subtipos de receptores de 5-HT,

particularmente os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} têm sido postulados em possuir um papel importante na patogênese da depressão. Os receptores 5-HT_{1A} estão localizados pré-sinápticamente no núcleo da rafe e em algumas regiões pós-sinápticamente (córtex cerebral, amígdala e hipocampo). Em ambas as localizações a ativação dos receptores 5-HT_{1A} levam a hiperpolarização neuronal o que é particularmente relevante nas respostas antidepressivas (Blier e Ward, 2003). A estimulação dos auto-receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos reduz a liberação e a síntese de 5-HT (Sprouse et al., 1998). Além disso, pacientes que respondem melhor ao tratamento antidepressivo quando comparados com os poucos responsivos apresentam diminuição no “binding” para receptores 5-HT_{1A}, sugerindo que esta condição favorece a resposta aos tratamentos antidepressivos que aumentam a função e ou a transmissão de 5-HT (Parsey et al., 2006; Moses-Kolko et al., 2007). Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no mecanismo de ação de várias classes de antidepressivos, incluindo os tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRSs) e os inibidores da MAO (Hensler, 2002; Blier e Ward, 2003).

Neste estudo, o pré-tratamento dos camundongos com WAY100635, antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, produziu efeitos comportamentais opostos dependendo da dose do ácido fólico. Quando administrado com uma dose sub-ativa de ácido fólico este composto foi capaz de ocasionar um efeito sinérgico e reduzir o tempo de imobilidade no TNF, porém, quando administrado com uma dose ativa de ácido fólico, o WAY100635 reverteu o efeito antidepressivo desta vitamina. Uma possível explicação para o efeito sinérgico do WAY100635 e ácido fólico é que esta vitamina estaria aumentando os níveis de 5-HT na fenda sináptica por inibir a sua recaptação. Adicionalmente, o WAY100635 estaria agindo preferencialmente em receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos (Ago et al., 2003), ocasionando o bloqueio destes auto-receptores levando também a um aumento dos níveis de 5-HT na fenda sináptica. Para corroborar com esta hipótese sabe-se que o antagonismo dos auto-receptores

de 5-HT_{1A} com a administração concomitante de ISRSs promove um aumento imediato e sustentado na concentração extracelular de 5-HT no córtex e hipocampo de ratos (Hjorth e Auerbach, 1994) e que o bloqueio destes receptores por WAY100635 potencializa o aumento extracelular de 5-HT produzido por antidepressivos serotoninérgicos (Romero et al., 1996).

Porém, o efeito do WAY100635 em reverter o efeito de uma dose ativa do ácido fólico é mais difícil de explicar. Entretanto, é possível que WAY100635 bloqueie o efeito anti-imobilidade da dose ativa de ácido fólico por, devido a um efeito somatório com o produzido pelo ácido fólico, aumentar a 5-HT na fenda sináptica. Embora, esta hipótese necessite de novos estudos para ser confirmada, hipótese similar foi formulada por Cousins e Seiden (2000) para explicar porque no modelo de triagem para drogas antidepressivas em ratos (baixas taxas de reforço- 72-s), uma dose sub-ativa de fluoxetina causa um efeito antidepressivo sinérgico com WAY100635, enquanto o efeito de uma dose ativa de fluoxetina é revertido pelo tratamento com WAY100635. Além disso, estes resultados são similares aos reportados em estudos prévios com agmatina (Zomkowski et al., 2004) e adenosina (Kaster et al., 2005).

Os receptores 5-HT₂ também estão amplamente distribuídos ao longo do encéfalo em regiões como o córtex pré-frontal e o hipocampo, num padrão que sugere que a sua ativação pode estar implicada na regulação de transtornos de humor (Hoyer et al., 1986; Celada et al., 2004). A regulação dos receptores 5-HT₂, especialmente os subtipos 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} ganhou importância quando alguns estudos demonstraram que a administração de drogas antidepressivas causa uma diminuição da densidade destes receptores (Yatham et al., 1999; Van Oekelen et al., 2003). Redrobe e Bourin (1997) mostraram que o bloqueio dos receptores 5-HT₂ leva a potencialização dos efeitos antidepressivos da imipramina e desipramina, mas não da fluoxetina e do citaloprom no TNF em camundongos. Em adição, alguns fármacos

antidepressivos como a nefazodona, trazodona e mirtazapina são antagonistas de receptores 5-HT_{2A} (Celada et al., 2004).

O efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF também foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com cetanserina (antagonista de receptores 5-HT_{2A/C}). Alguns estudos indicam que antagonismo de receptores 5-HT_{2A/2C} tem um significativo papel no mecanismo de ação de antidepressivos convencionais no TNF (Redrobe e Bourin, 1997; Elhwuegi, 2004). A reversão do efeito anti-imobilidade do ácido fólico pela cetanserina sugere que seu efeito é mediado pela interação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.

Estudos pré-clínicos e clínicos têm mostrado que a estimulação do sistema serotoninérgico causa efeitos no sistema noradrenérgico e vice-versa, confirmando que 5-HT e noradrenalina estão intimamente conectadas no sistema nervoso central (Gorman e Sullivan, 2000). Neste estudo prazosin (antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos) e ioimbina (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) foram capazes de reverter o efeito tipo-antidepressivo do ácido fólico. Este resultado indica que o ácido fólico pode exercer seu efeito no TNF por interagir com os receptores α_1 e α_2 adrenérgicos. Estes resultados estão de acordo com o fato que estes receptores estão implicados na ação de agentes antidepressivos (Richelson, 2001; Millan, 2004).

Considerando a estreita interação existente entre os sistemas glutamatérgico, noradrenérgico e serotoninérgico (Millan, 2004), a próxima etapa do trabalho consistiu na investigação do envolvimento dos receptores de glutamato NMDA e da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo do ácido fólico.

O receptor NMDA é um canal iônico regulado por ligantes e voltagem. No estado de repouso o fluxo de corrente iônica é bloqueado devido à ligação do íon magnésio no interior no canal. Quando há uma despolarização, geralmente causado por influxo de sódio o magnésio é deslocado e promove a entrada de cálcio e sódio através do canal (para revisão ver

Molinoff et al, 1994). A modulação farmacológica do receptor pode ser feita através da ligação de agonistas e antagonistas em diferentes sítios reguladores presentes no canal. O glutamato se liga em sítio específico no receptor NMDA, ação que é bloqueada pela presença do antagonista ácido D-amino-5-fosfonopentanóico (para revisão ver Petrie et al., 2000). O receptor NMDA pode ser bloqueado, não competitivamente por drogas como a fenciclidina, ketamina e dizocilpina (MK-801) que se ligam num sítio dentro do canal, conhecido como sítio PCP, devido à ligação da droga fenciclidina (para revisão ver Petrie et al., 2000). O papel dos receptores de NMDA na fisiopatologia da depressão tem sido reconhecido desde que estudos clínicos e pré-clínicos têm mostrado que antagonistas competitivos e não competitivos dos receptores de NMDA possuem propriedades antidepressivas. Além disso, tem sido demonstrado que fármacos antidepressivos reduzem o “binding”, a expressão e a função de receptores de NMDA (Boyer et al., 1998; Skolnick, 1999; Paul e Skolnick, 2003).

Nesta etapa do trabalho a completa reversão do efeito tipo-antidepressivo do ácido fólico pelo pré-tratamento dos camundongos com NMDA e o efeito sinérgico do ácido fólico com o MK-801 (antagonista não competitivo de receptores NMDA) indica que este efeito é dependente, ao menos em parte, da inibição dos receptores NMDA. Embora, estes dados não permitam concluir como ocorre esta interação, existem várias evidências da interação dos sistemas glutamatérgico, noradrenérgico e serotoninérgico nos mecanismos de ação de antidepressivos (Pittaluga et al., 2007; Szasz et al., 2007). Considerando que já foi demonstrado o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico no efeito antidepressivo do ácido fólico, pode-se especular que a inibição dos receptores de NMDA pode ser uma consequência de uma estimulação primária do sistema monoaminérgico pelo ácido fólico. De fato, NA e 5-HT podem inibir a liberação de glutamato (Furray et al., 1999; Maura et al., 2000). Além disso, um recente estudo mostrou que fluoxetina e desipramina, em concentrações clinicamente relevantes, inibem receptores NMDA (Szasz et al., 2007).

Outro mecanismo que pode estar envolvido no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF é a sua ação sobre a síntese de NO. Este é sintetizado a partir da L-arginina em consequência da ativação de receptores NMDA (Moncada et al., 1989) e age estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Esta enzima catalisa a conversão do GTP em GMPc (Snyder, 1992). Neste estudo o pré-tratamento de camundongos com L-arginina (substrato da NOS) ou SNAP (doador de NO) inibiu significativamente o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF. Estes resultados indicam que o efeito do ácido fólico pode ser dependente, pelo menos em parte, da inibição da síntese de NO e estão de acordo com outros estudos que mostraram que inibidores da NOS exercem efeito antidepressivo em modelos animais de depressão (Harkin et al., 1999; Yildiz et al., 2000; Harkin et al., 2003; Volke et al., 2003; Wegener et al., 2003). Além disso, o tratamento com inibidores de receptores NMDA e da NOS podem modular a neurotransmissão serotoninérgica aumentando a liberação de 5-HT em algumas regiões cerebrais (Wegener et al., 2003) e a 5-HT endógena parece ser importante para o efeito antidepressivo destes inibidores (Harkin et al., 2003), o que sugere que inibidores da NOS possam ser usados como estratégia terapêutica para aumentar a eficácia de antidepressivos serotoninérgicos (Harkin et al., 2004).

O tratamento dos camundongos com 7-nitroindazol (inibidor seletivo da NOS neuronal) ou com azul de metileno (inibidor da NOS e da guanilato ciclase solúvel) produziu um efeito sinérgico com uma dose sub-ativa de ácido fólico. Estes resultados estão de acordo com os que reportaram redução no tempo de imobilidade no TNF pelo tratamento com 7-nitroindazol (Yildiz et al., 2000; Volke et al., 2003) e azul de metileno (Eroglu e Caglayan, 1997).

A reversão do efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF pelo pré-tratamento dos camundongos com sildenafil, um inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (PDE5) foi outro achado interessante deste trabalho. Este dado, sugere que o ácido fólico exerce seu efeito antidepressivo através de uma diminuição dos níveis de GMPc, uma vez que as concentrações

intracelulares de GMPc são também reguladas pela PDE5, que catalisa a hidrólise dos segundos mensageiros AMPc e GMPc para produzir AMP e GMP, respectivamente (Denninger e Marletta, 1999). O sildenafil, portanto, aumenta o conteúdo de GMPc nos tecidos alvos (Beavo, 1995) e foi previamente relatado que ele é capaz de reverter o efeito antidepressivo do ODQ no TNF (Kaster et al., 2005). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que mostram o envolvimento da via L-arginina-NO-GMPc na fisiopatologia da depressão (Harkin et al., 1999; Yildiz et al., 2000).

Os resultados obtidos mostram que o ácido fólico exerce sua ação antidepressiva no TNF, pelo menos em parte, através de um mecanismo de ação dependente da inibição de receptores NMDA. Considerando que os opióides endógenos têm sido implicados no mecanismo de ação de antidepressivos (Berrocoso et al., 2004) e que a inibição de receptores NMDA parece estar associada à liberação de opióides endógenos (Maze e Fujinaga, 2000), nesta etapa do trabalho investigamos a participação sistema opióide na ação antidepressiva do ácido fólico no TNF.

O pré-tratamento dos animais com naloxona foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do ácido fólico na sua dose ativa e de reverter também o efeito antidepressivo sinérgico de doses sub-ativas de ácido fólico e MK-801, indicando que o efeito antidepressivo do ácido fólico envolve uma interação entre os receptores NMDA e o sistema opióide. Esta hipótese está de acordo com a proposta que antidepressivos induzem a liberação de peptídeos opióides (Gray et al., 1998) e que a inibição de receptores NMDA está associada com a liberação de peptídeos opióides (Maze e Fujinaga, 2000). Além disso, alguns trabalhos têm mostrado que a naloxona reverte o efeito antidepressivo da venlafaxina, um inibidor dual da recaptção de 5-HT e NA, no TNF (Berrocoso et al., 2004) como também da imipramina, um antidepressivo tricíclico que age como inibidor misto da recaptção de 5-HT e NA no modelo do desamparo aprendido (Tejedor-Real et al., 1995), o que sugere uma relação entre o sistema

opióide e o serotoninérgico na fisiopatologia da depressão. Como demonstramos em resultados anteriores o sistema serotoninérgico (5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/2C}) também está envolvido no mecanismo de ação do ácido fólico no TNF.

Alguns estudos têm mostrado o envolvimento do sistema opióide na fisiopatologia da depressão. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a administração de agonistas de receptores μ e δ -opióides apresenta efeitos antidepressivos no TNF (Broom et al., 2002; Torregrossa et al., 2006; Fichna et al., 2007; Vergura et al., 2008). Em adição, alguns estudos mostram que o sistema opióide está envolvido no mecanismo de ação dos antidepressivos clássicos (Devoize et al., 1984; Tejedor-Real et al., 1995; Zomkowski et al., 2005) e de alguns compostos dotados de atividade antidepressiva, como a agmatina (Zomkowski et al., 2005) e a adenosina (Kaster et al., 2007b). Além disso, reforçando a idéia que o sistema opióide exerce efeito na depressão, estudos clínicos indicam que compostos opióides como a β -endorfina e buprenorfina possuem efeitos antidepressivos (Bodkin et al., 1995; Darko et al., 1992) e a terapia eletroconvulsiva aumenta os níveis plasmáticos de β -endorfina, indicando que o tratamento da depressão refratária pode ser mediado por peptídeos opióides (Ghadirian et al., 1988).

Neste estudo mostramos que o ácido fólico parece interagir com sistema opióide uma vez que o pré-tratamento dos animais com naloxona foi capaz de reverter o seu efeito antidepressivo no TNF. Além disso, o pré-tratamento com naloxona metiodida, um análogo quartenário da naloxona, que não atravessa a barreira hematoencefálica não alterou o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF. Este resultado está de acordo com os dados de Kaster e colaboradores (2007b) que mostram que o pré-tratamento dos camundongos com naloxona, mas, não com naloxona metiodida foi capaz de reverter o efeito antidepressivo da adenosina no TNF e ainda nos permite concluir que o efeito antidepressivo do ácido fólico é dependente, pelo menos em parte, da atividade central dos receptores opióides.

Mostrou-se também que o ácido fólico produz efeito sinérgico com a morfina (agonista não seletivo de receptores opióides) em ativar o sistema opióide porque doses sub-ativas destes compostos são capazes de produzir comportamento antidepressivo específico no TNF, uma vez que estes tratamentos não alteraram a atividade locomotora dos animais. Um estudo prévio já havia demonstrado que morfina em doses mais elevadas (5-10 mg/kg, i.p.) produz um efeito antidepressivo no TNF, o qual é prevenido por naloxona (Zomkowski et al., 2005).

Este estudo também demonstrou que a redução do tempo de imobilidade ocasionado pelo ácido fólico no TNF foi bloqueado pelo pré-tratamento dos camundongos com naltrindol, um antagonista seletivo de receptores δ opióide. Este resultado sugere que o tratamento com ácido fólico ocasiona a ativação direta ou indireta dos receptores δ opióide, o que está de acordo com o fato que agonistas de receptores δ são efetivos em modelos de depressão em roedores (Tejedor-Real et al., 1998; Broom et al., 2002; Saitoh et al., 2004; Torregrossa et al., 2006; Vergura et al., 2008).

O pré-tratamento dos camundongos com naloxonazina (um antagonista de receptores μ 1 opióides) foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF, um achado consistente com a noção que a ativação destes receptores está envolvida no efeito antidepressivo do ácido fólico. A participação dos receptores μ 1 opióides no mecanismo de ação dos antidepressivos é sugerida por alguns estudos. Os agonistas dos receptores μ 1 opióides, oxicodona e oximorfona, têm ocasionado melhora do humor em pacientes com depressão maior severa e refratária (Stoll e Rueter, 1999).

Nestes resultados demonstrou-se que o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF é mediado também pela sua interação com o sistema opióide (receptores μ 1 e δ), o qual pode ser consequência da inibição dos receptores NMDA.

A depressão também tem sido associada a alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (Manji et al., 2001; para revisão ver: D'Sa e Duman, 2002; Gould e Manji, 2002; Hashimoto et al., 2004). Estas vias de transdução de sinal exercem um papel essencial no SNC e representam um alvo atrativo para o desenvolvimento de agentes farmacológicos para o tratamento dos distúrbios de humor (para revisão ver Manji et al., 1996). Sendo assim, o objetivo deste grupo de experimentos foi investigar a participação das proteínas cinases tais como: PKA, MAPK/ERK, CaMKII e PKC, na ação antidepressiva aguda do ácido fólico no TNF.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a redução do tempo de imobilidade no TNF pelo ácido fólico foi completamente bloqueada pelo pré-tratamento dos camundongos com o H-89, um inibidor específico da PKA. Este resultado indica a possível participação da PKA no efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF em camundongos. A PKA está envolvida em várias funções fisiológicas do SNC, como a síntese e liberação de neurotransmissores, expressão gênica, plasticidade sináptica, memória, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. O mecanismo mediado pela PKA é através da fosforilação de substratos específicos, que inclui o CREB (para revisão ver: D'Sa e Duman, 2002; Gould e Manji, 2002). A fosforilação de CREB ativa a expressão de genes como o BDNF, que tem sido fortemente implicado na sobrevivência celular e plasticidade neuronal (D'Sa e Duman, 2002; Hashimoto et al., 2004). O tratamento crônico com antidepressivos aumenta o RNAm para CREB e a expressão da proteína CREB no hipocampo (Gould e Manji, 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado que a via AMPc-PKA-CREB está envolvida na sobrevivência e plasticidade neuronal, e que o tratamento com antidepressivos causa uma “up regulation” desta via e aumentam a atividade da PKA (Duman et al., 2000; Popoli et al., 2000; Akin et al., 2005).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o pré-tratamento de camundongos com o PD98059, um inibidor da MAPK/ERK cinase, não inibiu o efeito anti-imobilidade causado pelo ácido fólico no TNF. Este resultado sugere que a via MAPK/ERK não participa do efeito antidepressivo agudo do ácido fólico no TNF.

A enzima CaMKII desempenha um papel importante na fisiopatologia e no tratamento de vários distúrbios relacionados ao estresse (Du et al., 2004). Vários trabalhos sugerem que a CaMKII representa um alvo para drogas antidepressivas (Popoli et al., 2000; Du et al., 2004; Hashimoto et al., 2004). O tratamento crônico com paroxetina, fluvoxamina e venlafaxina provocou um aumento na fosforilação e na atividade da CaMKII em frações subcelulares do hipocampo (Popoli et al., 2000). Neste trabalho foi demonstrado que o efeito antidepressivo agudo do ácido fólico foi revertido pelo pré-tratamento dos camundongos com KN-62, um inibidor de CaMKII. Este resultado indica que, pelo menos em parte, o efeito antidepressivo do ácido fólico pode ser devido a uma ativação da CaMKII.

As drogas antidepressivas ativam cascatas de transdução de sinal que envolve também a PKC (Popoli et al., 2000; Hashimoto et al., 2004; Akin et al., 2005). Além disso, a PKC parece exercer um papel importante no mecanismo de ação terapêutica de drogas antidepressivas como desipramina e fluoxetina (Mann et al., 1995). No entanto, neste trabalho o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF não foi revertido pelo pré-tratamento dos camundongos com a queleritrina, um inibidor da PKC, sugerindo que esta via não participa do seu efeito antidepressivo no TNF.

Como conclusão dos resultados apresentados nesta etapa da pesquisa sobre o papel do ácido fólico na depressão, mostrou-se que a administração aguda ou crônica do ácido fólico é capaz de produzir efeito antidepressivo no TNF e no TSC. Além disso, foi evidenciado que este efeito é dependente da sua interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, glutamatérgico (receptores NMDA), opioidérgico e da via L-arginina NO. Além disso, estes

resultados indicam que o ácido fólico exerce seu efeito antidepressivo no TNF por modular vias de sinalização celular (PKA e CaMKII) que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular o que poderia explicar, pelo menos em parte, a neuroproteção ocasionada pelo ácido fólico nos modelos de depressão.

Embora a maioria dos estudos relacione o ácido fólico com a fisiopatologia da depressão (para revisão ver Bottiglieri, 2005; Coppen e Bollander-Gouaille, 2005) alguns estudos sugerem que o ácido fólico possa estar envolvido também na fisiopatologia do transtorno bipolar. Hasanah e colaboradores (1997) mostraram que pacientes com mania apresentam níveis significativamente baixos de ácido fólico em células eritrocitárias, sugerindo que a deficiência do ácido fólico está envolvida com a mania. Além disso, um estudo demonstrou que a suplementação com ácido fólico aumenta o efeito profilático do lítio, diminuindo as co-morbidades afetivas (Coppen e Abou-Saleh, 1982; Coppen et al., 1986).

O transtorno bipolar envolve uma combinação de episódios de mania e depressão, que se alternam ou podem ocorrer simultaneamente. A mania tem sido associada com a diminuição da atividade da bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase. Deste modo, o uso pré-clínico de ouabaína (inibidor da bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase), uma droga com propriedades estimulantes, tem sido proposto para induzir um modelo animal de mania (El-Mallakh et al., 1995, 2003; Ruktanonchai et al., 1998; Decker et al., 2000) o que confere ao modelo a validade de *constructo*. Um aspecto fundamental para a validade de um modelo animal é a sua habilidade de mimetizar os sintomas da doença em humanos ou ser responsivo aos tratamentos farmacológicos clássicos. As mudanças comportamentais induzidas pela ouabaína (hipo ou hiper locomoção) por serem similares àquelas encontradas em humanos com a doença conferem a este modelo a validade fenomenológica ou de *face*. Além disso, estas mudanças comportamentais ocasionadas pela ouabaína são prevenidas por estabilizadores de humor

como o lítio e a carbamazepina, evidenciando a validade preditiva deste modelo (Li et al., 1997; El-Mallakh et al., 2003; Hennion et al., 2003).

Nesta etapa do estudo, o objetivo foi verificar o envolvimento do ácido fólico na fisiopatologia do TB. Para isto, utilizou-se um modelo de mania em ratos utilizando ouabaína. O efeito da administração de ouabaína causou grande aumento na atividade locomotora no campo aberto, o que foi prevenido pelo pré-tratamento via oral dos ratos com ácido fólico ou LiCl (controle positivo). O mecanismo da ação antimaníaca do lítio parece estar relacionado, pelo menos em parte, com a sua capacidade de reverter a redução dos níveis de sódio intracelulares causados pela ouabaína em ratos (El-Mallakh e Huff, 2001). Corroborando com este resultado outros estudos também demonstraram o efeito do lítio em reverter a hiperlocomoção ocasionada pela ouabaína (El-Mallakh et al., 1995; Cooper et al., 1996; El-Mallakh et al., 2003; Herman et al., 2007).

Desta forma, pode-se sugerir que o ácido fólico, assim como lítio, poderia prevenir alterações nas concentrações intracelulares de sódio induzidas pela ouabaína. Além disso, estes resultados estão de acordo com um trabalho que mostrou que o pré-tratamento com ácido fólico previne a diminuição da atividade da bomba Na^+K^+ -ATPase induzida pela homocisteína (Matté et al., 2006).

Alguns estudos têm demonstrado aumento da lipoperoxidação e alterações nas enzimas antioxidantes em indivíduos com TB (Kuloglu et al., 2002; Ranjekar et al., 2003; Ozcan et al., 2004), sugerindo que o estresse oxidativo possa ter um papel na fisiopatologia deste transtorno. Além disso, há evidências que o tratamento crônico com lítio e valproato inibem a lipoperoxidação e a oxidação de proteínas *in vitro* (Shao et al., 2005; Wang et al., 2003). No presente estudo demonstrou-se que a administração de ouabaína produz alterações neuroquímicas indicativas de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de ratos, as quais poderiam estar relacionadas à fisiopatologia da doença. A diminuição da atividade

enzimática da GPx em hipocampo e da GR em córtex cerebral e hipocampo foi acompanhada pelo aumento nos níveis de TBARS em córtex cerebral e hipocampo de ratos tratados com ouabaína. Nenhuma alteração nos níveis de GSH-t foi ocasionada pelos tratamentos (dados não mostrados). Corroborando com estes dados, alguns estudos mostraram aumento plasmático nos níveis de TBARS (Kuloglu et al., 2002; Machado-Vieira et al, 2007; Ozcan et al., 2004) e diminuição da atividade da enzima GPx (Ozcan et al., 2004) em pacientes com TB.

No entanto, o pré-tratamento dos animais com ácido fólico e com LiCl foi capaz de prevenir estas alterações. A reversão da lipoperoxidação pelo pré-tratamento com LiCl está de acordo com o estudo que mostra que o tratamento *in vitro* com lítio e valproato exercem efeitos protetores contra a lipoperoxidação e a oxidação de proteínas (Shao et al., 2005; Wang et al., 2003). Além disso, o tratamento com lítio protegeu contra o estresse oxidativo em um modelo de mania induzido por D-anfetamina em córtex pré-frontal e hipocampus de ratos (Frey et al., 2006c). Embora, não seja possível descartar a possibilidade de que o tratamento com ácido fólico tenha ocasionado um aumento na síntese das enzimas antioxidantes GPx e GR a prevenção, pelo tratamento com ácido fólico, da diminuição da atividade destas enzimas antioxidantes em córtex cerebral e hipocampo induzidas por ouabaína está de acordo alguns estudos que mostram as propriedades antioxidantes desta vitamina (Rezk et al., 2003; Joshi et al., 2001; Gliszczyńska-Swigło and Muzolf, 2007). Estudos mostram que a deficiência de folato está associada com estresse oxidativo em fígado e rins de ratos (Díez et al., 2005; Huang et al., 2001). Além disso, alguns estudos pré-clínicos têm demonstrado que o ácido fólico é capaz de reverter danos oxidativos encontrados em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (Dhitavat et al., 2005; Ho et al., 2003) e o Parkinson (Duan et al., 2002).

A função da enzima GPx é reduzir lipoperoxídeos em seus correspondentes álcoois e reduzir peróxido de hidrogênio em água e a função da GR é reduzir a glutathiona dissulfeto ou

oxidada (GSSG) na forma sulfidril ou reduzida (GSH), a qual é um importante antioxidante celular. Desta forma, a diminuição das atividades destas enzimas encontrada nos animais tratados com ouabaína pode indicar uma falha na proteção do organismo contra o estresse oxidativo, o que se reflete neste trabalho também pelo aumento dos níveis de TBARS nos ratos tratados com ouabaína.

Neste trabalho mostrou-se que as alterações comportamentais (hiperlocomoção) e neuroquímicas (parâmetros relacionados a estresse oxidativo) ocasionadas pela ouabaína foram prevenidas pelo pré-tratamento sistêmico (gavagem) dos animais com ácido fólico ou com LiCl. Estes resultados nos permitem elaborar a hipótese que o ácido fólico tem, além de um efeito antidepressivo, um efeito antimaníaco por: 1) possivelmente prevenir a diminuição da atividade da bomba Na^+K^+ -ATPase; 2) proteger o organismo do dano oxidativo através da modulação da atividade das enzimas antioxidantes.

Estes dados são promissores do ponto de vista terapêutico, uma vez que sugere que o ácido fólico tem além do efeito antidepressivo um potencial efeito antimaníaco.

7. Conclusões

- ✓ O ácido fólico produz efeito antidepressivo específico quando administrado por via oral no TNF e no TSC, dois modelos animais preditivos de atividade antidepressiva;
- ✓ O ácido fólico e o ácido folínico produzem efeito antidepressivo específico quando administrado por via i.c.v. no TNF e no TSC, dois modelos animais preditivos de atividade antidepressiva;
- ✓ A ação antidepressiva do ácido fólico e do ácido folínico não pode ser atribuída a um aumento da atividade locomotora dos animais;
- ✓ A depleção da serotonina endógena previne o efeito antidepressivo do ácido fólico no TNF, o que indica o envolvimento do sistema serotoninérgico na sua ação;
- ✓ Os testes com antagonistas farmacológicos sugerem que o efeito antidepressivo do ácido fólico envolve interações com os sistemas serotoninérgico, via receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e com o noradrenérgico, via adrenoceptores α_1 e α_2 ;
- ✓ A ação antidepressiva do ácido fólico envolve também o sistema glutamatérgico (inibição de receptores NMDA) e a via L-arginina-NO-GMPc (inibição de síntese de NO e de GMPc);
- ✓ A ação antidepressiva do ácido fólico envolve também uma interação com o sistema opióide (receptores δ e μ_1 -opióides);
- ✓ A ação antidepressiva do ácido fólico envolve ainda a participação de cascatas de sinalização intracelular dependentes de PKA e CaMKII;
- ✓ O ácido fólico também foi capaz de reverter os efeitos comportamentais (hiperlocomoção) e neuroquímicos (aumento nos níveis de TBARS e diminuição da atividade das enzimas GPx em hipocampo e da GR em córtex cerebral e hipocampo) ocasionados pela ouabaína (modelo de mania) em ratos, indicando um efeito antimaníaco desta vitamina. Este parece ser dependente da prevenção da inibição da bomba Na⁺K⁺-

ATPase e de suas propriedades antioxidantes. Além disso, seu efeito no modelo de mania empregado neste estudo é comparável ao exercido pelo lítio, um fármaco utilizado no tratamento do transtorno bipolar.

8. Perspectivas

- ✓ Analisar amostras do córtex cerebral e hipocampo de animais tratados durante 30 dias com ácido fólico e veículo (grupo controle) para verificar e comparar a neurogênese hipocampal;
- ✓ Verificar se o modelo de depressão (induzida por homocisteína) e de mania (induzido por ouabaína) induz alterações morfológicas no hipocampo e córtex cerebral (morte celular) e se estas alterações são revertidas pelo tratamento com ácido fólico;
- ✓ Verificar se a ação antidepressiva do ácido fólico está relacionada com o seu efeito antioxidante;
- ✓ Analisar a ação antioxidante do ácido fólico *in vitro*.

9. Referências Bibliográficas

ABOU-SALEH, M.T., COPPEN, A. Folic acid and the treatment of depression. **J Psychosom Res.**, 61, 285-7, 2006.

AGO, Y., KOYAMA, Y., BABA, A., MATSUDA, T. Regulation by 5-HT_{1A} receptors of the in vivo release of 5-HT and DA in mouse frontal cortex. **Neuropharmacology**, 45, 1050-1056, 2003.

AKERBOOM, T.P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.**, 77, 373- 382, 1981.

AKIN, D., MANIER, D.H., SANDERS-BUSH, E., SHELTON, R.C. Signal transduction abnormalities in melancholic depression. **Int J Neuropsychopharmacol.**, 8, 5-16, 2005.

AKISKAL, H.S., HANTOUCHE, E.G., BOURGEOIS, M.L., AZORIN, J.M., SECHTER, D., ALLILAIRE, J.F., CHATENÊT-DUCHÊNE, L., LANCRENON, S. Toward a refined phenomenology of mania: combining clinician-assessment and self-report in the French EPIMAN study. **J Affect Disord.**, 67, 89-96, 2000.

ALCÂNTARA, I., SCHMITT, R., SCHWARZTHAUP, A.W., CHACHAMOVICH, E., SULZBACH, M.F.V., LAFORET PADILHA, R.T., CANDIAGO, R.H., LUCAS, R.M. Avanços no diagnóstico do transtorno do humor bipolar. **R Psiquiatr.**, 25, 22-32, 2003.

ALIYAZICIOĞLU, R., KURAL, B., COLAK, M., KARAHAN, S.C., AYVAZ, S., DEĞER, O. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. **Tohoku J Exp Med.**, 213, 79-87, 2007.

ALMEIDA, R.C., SOUZA, D.G., SOLETTI, R.C., LÓPEZ, M.G., RODRIGUES, A.L., GABILAN, N.H. Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. **Neurosci Lett.**, 395, 93-97, 2006.

ALPERT, J.E, MISCHOULON, D., NIERENBERG, A.A., FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, 16, 544-581, 2000.

ALPERT, J.E., MISCHOULON, D., RUBENSTEIN, G.E., BOTTONARI, K., NIERENBERG, A.A., FAVA, M. Folinic acid (Leucovorin) as an adjunctive treatment for SSRI-refractory depression. **Ann Clin Psychiatry**, 14, 33-38, 2002.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Mood Disorders**. In: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Revised. Washington, DC: American Psychiatric Association. p. 317 345.

ANDERSON, I.M. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. **J Affect Disord.**, 58, 19-36, 2000.

ANDREATINI, R. A importância dos modelos animais em psiquiatria. **Rev Bras Psiquiatr.**, 24, 4, 164, 2002.

APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **J Intern Med.**, 261, 44-52, 2007.

BALDESSARINI, R.J. **Drugs and the treatment of psychiatric disorders.** In: Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1996.

BAUNGARTNER, A., GRAF, K.J., KURTEN, I. The dexamethasone suppression test in depression in schizophrenia, and during emotional stress. **Biol Psychiat.**, 20, 675-679, 1985.

BEAVO, J.A., Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol. Rev.**, 75, 725-748, 1995.

BELZUNG, C. **Measuring exploratory behavior.** In: W.E. Crusio and R.T. Gerlai, Editors, Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences), Elsevier, Amsterdam (1999), pp. 739-749.

BERMAN, R.M., CAPPIELLO, A., ANAND, A., OREN, D.A., HENINGER, G.R., CHARNEY, D.S., KRYSTAL, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, 47, 351-354, 2000.

BERROCOSO, E., ROJAS-CORRALES, M.O., MICÓ, J.A. Non-selective opioid receptor antagonism of the antidepressant-like effect of venlafaxine in the forced swimming test in mice. **Neurosci Lett.**, 363, 25-28, 2004.

BERTON, O., NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci.**, 7, 137-151, 2006.

BILICI, M., E.F.E., H., KOROGLU, M.A., UYDU, H.A., BEKAROGLU, M., DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord.**, 64, 43-51, 2001.

BISHOP, A., ANDERSON, J.E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. **Toxicology**, 208, 193-205, 2005.

BLENDY, J.A. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry**, 59, 144-1150, 2006.

BLIER, P., WARD, N.M. Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression? **Biol Psychiatry**, 53, 193-203, 2003.

BODKIN, J.A., ZORNBERG, G.L., LUKAS, S.E., COLE, J.O. Buprenorphine treatment of refractory depression. **J Clin Psychopharmacol.**, 15, 49-57, 1995.

BOTEZ, M.I., YOUNG, S.N., BACHEVALIER, J., GAUTHIER, S. Effect of folic acid and vitamin B12 deficiencies on 5-hydroxyindoleacetic acid in human cerebrospinal fluid. **Ann Neurol.**, 12, 479-484, 1982.

BOTTIGLIERI, T. Homocysteine and folate metabolism in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 29, 1103-1112, 2005.

BOURIN, M., CHENU, F., RIPOLL, N., DAVID, D.J. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res.**, 2005 164, 266-269, 2005.

BOYER, P.A., SKOLNICK, P., FOSSOM, L.H. Chronic administration of imipramine and citalopram alters the expression of NMDA receptor subunit mRNAs in mouse brain. A quantitative in situ hybridization study. **J Mol Neurosci.**, 10, 219-233, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, 72, 248-254, 1976.

BROOM, D.C., JUTKIEWICZ, E.M., FOLK, J.E., TRAYNOR, J.R., RICE, K.C., WOODS, J.H. Nonpeptidic delta opioïde receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats. **Neuropsychopharmacology**, 26, 744-755, 2002.

BROWN, E.S., SUPPES, T., ADINOFF, B., THOMAS, N.R. Drug abuse and bipolar disorder: comorbidity or misdiagnosis? **J Affect Disord.**, 65, 105-115, 2001.

BRUNELLO, N., MENDLEWICZ, J., KASPER, S., LEONARD, B., MONTGOMERY, S., NELSON, J.C., PAYKEL, E., VERSIANI, M., RACAGNI, G. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 12, 461-475, 2002.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Meth Enzymol.**, 113, 484-489, 1985.

CASAROTTO, P.C., ANDREATINI, R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 17, 735-742, 2007.

CASTRÉN, E., VÖIKAR, V., RANTAMÄKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Curr Opin Pharmacol.**, 7, 18-21, 2007.

CATLIN, D.H., GORELICK, D.A., GERNER, R.H., HUI, K.K., AND LI, C.H. Clinical effects of beta-endorphin infusions. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.**, 22, 465-472, 1980.

CELADA, P., PUIG, M., AMARGÓS-BOSCH, M., ADELL, A., ARTIGAS, F. The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. **J Psychiatry Neurosci.**, 29, 252-65, 2004.

CHEN, Z., SKOLNICK, P. Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. **Expert Opin Investig Drugs**, 16, 1365-1377, 2007.

COOPER, D.A., PIPER, D.C., UPTON, N., LESLIE, R.A. The effect of lithium on the hypermotility response to the center administration of ouabain in the rat. **BMJ**, 118 (Suppl.), 62, 1996.

COPPEN, A., ABOU-SALEH, M.T. Plasma folate and affective morbidity during long-term lithium therapy. **Br J Psychiatry**, 141, 87-89, 1982.

COPPEN, A., BAILEY, J. Enhancement of the antidepressant action of fluoxetine by folic acid: a randomised, placebo controlled trial. **J Affect Disord.**, 60, 121-130, 2000.

COPPEN, A., BOLANDER-GOUAILLE, C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. **J Psychopharm.**, 19, 59-65, 2005.

COPPEN, A., CHAUDHRY, S., SWADE, C. Folic acid enhances lithium prophylaxis. **J Affect Disord.**, 10, 9-13, 1986.

COPPEN, A., SWADE, C., JONES, S.A., ARMSTRONG, R., BLAIR, J.A., LEEMING, R.J. Depression and tetrahydrobiopterin: the folate connection. **J Affect Disord.**, 16, 103-107, 1989.

COPPEN, A.J., DOOGAN, D.P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. **J Clin Psychiatry**, 49, 4-11, 1988.

COUSINS, M.S., SEIDEN, L.S. The serotonin-1A receptor antagonist WAY-100635 modifies fluoxetine's antidepressant-like profile on the differential reinforcement of low rates 72-s schedule in rats. **Psychopharmacology**, 148, 438-42, 2000.

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

CRYAN, J.F., MARKOU, A., LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci.**, 23, 238-245, 2002.

CRYAN, J.F., SLATTERY, D.A. Animal models of mood disorders: recent developments. **Curr Opin Psychiatry**, 20, 1-7, 2007.

DA SILVA, G.D., MATTEUSSI, A.S., DOS SANTOS, A.R., CALIXTO, J.B., RODRIGUES, A.L. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **Neuroreport**, 11, 3699-3702, 2000.

DABAN, C., VIETA, E., MACKIN, P., YOUNG, A.H. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. **Psychiatr Clin North Am.**, 28, 469-80, 2005.

DARDENNES, R., THUILE, J., FRIEDMAN, S., GUELF, J.D. The costs of bipolar disorder. **Encephale**, 32, 18-25, 2006.

DARKO, D.F., RICH, S.C., GILIN, J.C., GOLSHAN, S. Association of β -endorphin with specific clinical symptoms of depression. **Am. J. Psychiatry**, 149, 1162-1167, 1992.

DECKER, S., GRIDER, G., COBB, M., LI, X.P., HUFF, M.O., EL-MALLAKH, R.S., LEVY, R.S. Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced hyperlocomotion in the development of an animal model for bipolar illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 24, 455-462, 2000.

DENNINGER, J.W., MARLETTA, M.A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, 1411, 334-350, 1999.

DEVOIZE, J.L., RIGAL, F., ESCHALIER, A., TROLESE, J.F., RENOUX, M. Influence of naloxone on antidepressant drug effects in the forced swimming test in mice. **Psychopharmacology**, 84, 71-75, 1984.

DHITAVAT, S., ORTIZ, D., ROGERS, E., RIVERA, E., SHEA, T.B. Folate, vitamin E, and acetyl-L-carnitine provide synergistic protection against oxidative stress resulting from exposure of human neuroblastoma cells to amyloid-beta. **Brain Res.**, 1061, 114-1147, 2005.

DÍEZ, N., PÉREZ, R., HURTADO, V., SANTIDRIÁN, S. Hyperhomocysteinaemia induced by dietary folate restriction causes kidney oxidative stress in rats. **Br J Nutr.**, 94, 204-210, 2005.

DINGLELINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev.**, 51, 7-61, 1999.

DJUKIC, A. Folate-responsive neurologic diseases. **Pediatr Neurol.**, 37, 387-397, 2007.

DJUROVIĆ, D., MILIĆ-ASKRABIĆ, J., MAJKIĆ-SINGH, N. Serum beta-endorphin level in patients with depression on fluvoxamine. **Farmacol.**, 54, 130-133, 1999.

D'SA, C., DUMAN, R.S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord.**, 4, 183-194, 2002.

DU, J., SZABO, S.T., GRAY, N.A., MANJI, H.K. Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. **Int. J Neuropsychopharmacol.**, 7, 243-248, 2004.

DUAN, W., LADENHEIM, B., CUTLER, R.G., KRUMAN, I.I., CADET, J.L., MATTSON, M.P. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **J Neurochem.**, 80, 101-110, 2002.

DUCOTTET, C., BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. **Physiol Behav.**, 81, 417-426, 2004.

DUCOTTET, C., GRIEBEL, G., BELZUNG, C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 27, 625-631, 2003.

DUMAN, R.S. Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. **Biol Psychiatry**, 44, 324-335, 1998.

DUMAN, R.S. Structural alterations in depression: cellular mechanisms underlying pathology and treatment of mood disorders. **CNS Spectr.**, 7, 140-142, 2002.

DUMAN, R.S., HENINGER, G.R., NESTLER, E.J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry**, 54, 597-606, 1997.

DUMAN, R.S., MALBERG, J., NAKAGAWA, S., D'SA, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol. Psychiatry**, 48: 732-739, 2000.

DUMAN, R.S., MALBERG, J., THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. **Biol. Psychiatry**, 46, 1181-1191, 1999.

DUNN, A.J., SWIERGIEL, A.H., BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? **Neurosci Biobehav Rev.**, 29, 891-909, 2005.

ECKELI, A.L., DACH, F., RODRIGUES, A.L. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. **Neuroreport**, 11, 1839-1843, 2000.

ECKERT, G.P. Local Food – Nutraceuticals. University of Frankfurt. Disponível em <<http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/EU-Web/Goethe.htm>> acessado em: 14 de dezembro de 2007.

EINAT, H., YUAN, P., GOULD, T.D., LI, J., DU, J.H., ZHANG, L., MANJI, H.K., CHEN, G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. **J Neurosci.**, 23, 7311-7316, 2003.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol.* **Biol Psychiatry**, 28, 435-451, 2004.

EL-MALLAKH, R.S., EL-MASRI, M.A., O'MALLEY HUFF, M., LI, X.P., DECKER, S., LEVY, R.S. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. **Bipolar Disord.**, 5, 362-365, 2003.

EL-MALLAKH, R.S., HARRISON, L.T., LI, R., CHANGARIS, D.G., LEVY, R.S. An animal model for mania: preliminary results. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 19, 955-962, 1995.

EL-MALLAKH, R.S., HUFF, M.O. Mood stabilizers and ion regulation. **Harv Rev Psychiatry**, 9, 23-32, 2001.

EL-MALLAKH, R.S., WYATT, R.J. The Na,K-ATPase Hypothesis for Bipolar Illness. **Biol Psychiatry**, 37, 235-244, 1995.

ERGÜN, Y., ERGÜN, U.G. Prevention of pro-depressant effect of L-arginine in the forced swim test by NG-nitro-L-arginine and [1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]. **Eur J Pharmacol.**, 554, 150-154, 2007.

EROĞLU, L., CAĞLAYAN, B. Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. **Pharmacol Res.**, 36, 381-385, 1997.

ESPLUGUES, J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol.**, 135, 1079-1095, 2002.

EYER, P., PODHRADSKÝ, D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. **Anal Biochem.** 153, 57-66, 1986.

FAFOUTI, M., PAPARRIGOPOULOS, T., LIAPPAS, J., MANTOUVALOS, V., TYPALDOU, R., CHRISTODOULOU, G. Mood disorder with mixed features due to vitamin B(12) and folate deficiency. **Gen Hosp Psychiatry**, 24, 106-109, 2002.

FAGIOLINI, A., KUPFER, D.J., MASALEHDAN, A., SCOTT, J.A., HOUCK, P.R., FRANK, E. Functional impairment in the remission phase of bipolar disorder. **Bipolar Disord.**, 7, 281-285, 2005.

FAVA, M., BORUS, J.S., ALPERT, J.E., NIERENBERG, A.A., ROSENBAUM, J.F., BOTTIGLIERI, T. Folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder. **Am J Psychiatry**, 154, 426-428, 1997.

FICHNA, J., JANECKA, A., PIESTRZENIEWICZ, M., COSTENTIN, J., DO REGO, J.C. Antidepressant-like effect of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mice. **Neuropsychopharmacology**, 32, 813-821, 2007.

FINKELSTEIN, J.D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **Eur J Pediatr.**, 157 Suppl 2, 40-44, 1998.

FLOHÉ, L., GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, 105, 114-121, 1984.

- FOLSTEIN, M., LIU, T., PETER, I., BUELL, J., ARSENAULT, L., SCOTT, T., QIU, W.W. The homocysteine hypothesis of depression. **Am J Psychiatry**, 164,861-867, 2007.
- FORLENZA, M.J., MILLER, G.E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. **Psychosom Med.**, 68, 1-7, 2006.
- FORRAY, M.I., BUSTOS, G., GYSLING, K. Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. **J Neurosci Res.**, 55, 311-320, 1999.
- FRAZER, A. Pharmacology of antidepressants. **J. Clin. Psychopharmacol.**, 17 (Suppl 1): 2S-18S, 1997.
- FREY, B.N., ANDREAZZA, A.C., KUNZ, M., GOMES, F.A., QUEVEDO, J., SALVADOR, M., GONÇALVES, C.A., KAPCZINSKI, F. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 31, 283-285, 2007.
- FREY, B.N., MARTINS, M.R., PETRONILHO, F.C., DAL-PIZZOL, F., QUEVEDO, J., KAPCZINSKI, F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. **Bipolar Disord.**, 8, 275-280, 2006b.
- FREY, B.N., VALVASSORI, S.S., RÉUS, G.Z., MARTINS, M.R., PETRONILHO, F.C., BARDINI, K., DAL-PIZZOL, F., KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. **Neurochem Res.**, 31, 699-703, 2006a.
- FREY, B.N., VALVASSORI, S.S., RÉUS, G.Z., MARTINS, M.R., PETRONILHO, F.C., BARDINI, K., DAL-PIZZOL, F., KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J Psychiatry Neurosci.**, 31, 326-32, 2006c.
- FUMAGALLI, F., MOLTENI, R., CALABRESE, F., FRASCA, A., RACAGNI, G., RIVA, M.A. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. **J Neurochem.**, 93, 1551-1160, 2005.
- GABILONDO, A.M., MEANA, J.J., GARCIA-SEVILLA, J.A. Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. **Brain Res.**, 682, 245-250, 1995.
- GARERI, P., FALCONI, U., DE FAZIO, P., DE SARRO, G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. **Prog Neurobiol.**, 61, 353-396, 2000.
- GHADIRIAN, A.M., GIANOULAKIS, C.H., NAIR, N.P. The effect of electroconvulsive therapy on endorphins in depression. **Biol Psychiatry**, 23, 459-464, 1988.
- GLISZCZYŃSKA-SWIGŁO, A., MUZOLF, M. pH-Dependent radical scavenging activity of folates. **J Agric Food Chem.**, 55, 8237-8242, 2007.

GOLD, P.W., WONG, M.L., CHROUSOS, G.P., LICINIO, J. Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications. **Mol Psychiatry**, 1, 257-264, 1996.

GORMAN, J.M., SULLIVAN, G. Noradrenergic approaches to antidepressant therapy. **J Clin Psychiatry**, 1, 13-6, 2000.

GOSPE, S.M. JR, GIETZEN, D.W., SUMMERS, P.J., LUNETTA, J.M., MILLER, J.W., SELHUB, J., ELLIS, W.G., CLIFFORD, A.J. Behavioral and neurochemical changes in folate-deficient mice. **Physiol Behav.**, 58, 935-41, 1995.

GOULD, T.D., EINAT, H., BHAT, R., MANJI, H.K. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. **Int J Neuropsychopharmacol.**, 7, 387-390, 2004.

GOULD, T.D., MANJI, H.K. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **J Psychosom Res.**, 53, 687-67, 2002.

GRAY, A.M., SPENCER, P.S., SEWELL, R.D. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. **Br J Pharmacol.**, 124, 669-674, 1998.

HARKIN, A., CONNOR, T.J., BURNS, M.P., KELLY, J.P. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 14, 274-281, 2004.

HARKIN, A., CONNOR, T.J., WALSH, M., S.T., JOHN, N., KELLY, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, 44, 616-23, 2003.

HARKIN, A.J., BRUCE, K.H., CRAFT, B., PAUL, I.A. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. **Eur J Pharmacol.**, 372, 207-213, 1999.

HASANAH, C.I., KHAN, U.A., MUSALMAH, M., RAZALI, S.M. Reduced red-cell folate in mania. **J Affect Disord.**, 46, 95-99, 1997.

HASHIMOTO K, SHIMIZU E, IYO M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. **Brain Res Brain Res Rev.**, 45, 104-114, 2004.

HEIBERG, I.L., WEGENER, G., ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behav Brain Res.**, 134, 479-484, 2002.

HENNION, J.P., EL-MASRI, M.A., HUFF, M.O., EL-MAILAKH, R.S. Evaluation of neuroprotection by lithium and valproic acid against ouabain-induced cell damage. **Bipolar Disord.**, 4,201-6, 2002.

HENSLER, J.G. Differential regulation of 5-HT_{1A} receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. **Neuropsychopharmacology**, 26, 565-73, 2002.

HERMAN, L., HOUGLAND, T., EL-MALLAKH, R.S. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. **Neurosci Biobehav Rev.**, 31, 874-881, 2007.

HJORTH, S., AUERBACH, S.B. Further evidence for the importance of 5-HT_{1A} autoreceptors in the action of selective serotonin reuptake inhibitors. **Eur J Pharmacol.**, 260, 251-255, 1994.

HO, P.I., ASHLINE, D., DHITAVAT, S., ORTIZ, D., COLLINS, S.C., SHEA, T.B., ROGERS, E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. **Neurobiol Dis.**, 14, 32-42, 2003.

HO, P.I., ORTIZ, D., ROGERS, E., SHEA, T.B. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. **J Neurosci Res.**, 70, 694-702, 2002.

HOEFFLER, J.P., DEUTSCH, P.J., LIN, J., HABENER, J.F. Distinct adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol ester-responsive signal transduction pathways converge at the level of transcriptional activation by the interactions of DNA-binding proteins. **Mol Endocrinol.**, 5, 868-880, 1989.

HOLSBOER, F., BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocr Rev.**, 17, 187-205, 1996.

HOYER, D., PAZOS, A., PROBST, A., PALACIOS, J.M. Serotonin receptors in the human brain: II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ recognition sites. **Brain Res.**, 376, 97-107, 1986.

HUANG, R.F., HSU, Y.C., LIN, H.L., YANG, F.L. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. **J Nutr.**, 131, 33-38, 2001.

ISKANDAR, B.J., NELSON, A., RESNICK, D., PATE SKENE, J.H., GAO, P., JOHNSON, C., COOK, T.D., HARIHARAN, N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. **Ann Neurol.**, 56, 221-227, 2004.

JOSHI, R., ADHIKARI, S., PATRO, B.S., CHATTOPADHYAY, S., MUKHERJEE, T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. **Free Radic Biol Med.**, 30, 1390-1399, 2001.

KALUEFF, A.V., LOU, Y.R., LAAKSI, I., TUOHIMAA, P. Increased grooming behavior in mice lacking vitamin D receptors. **Physiol Behav.**, 82, 405-409, 2004.

KANASHIRO, C.A., KHALIL, R.A. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, 25, 974-985, 1998.

KASTER, M.P., BUDNI, J., BINFARÉ, R.W., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 31, 690-696, 2007a.

KASTER, M.P., BUDNI, J., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Pharmacological evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, 576, 91-98, 2007b.

KASTER, M.P., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES A.L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Res Bull.**, 67, 53-61, 2005.

KENDLER, K.S., HETTEMA, J.M., BUTERA, F., GARDNER, C.O., PRESCOTT, C.A. Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety. **Arch Gen Psychiatry.**, 60, 789-796, 2003.

KEW, J.N., KEMP, J.A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, 179, 4-29, 2005.

KIM, W.K., PAE, Y.S. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. **Neurosci Lett.**, 216, 117-20, 1996.

KLINE, N.S., LI, C.H., LEHMANN, H.E., LAJTHA, A., LASKI, E., AND COOPER, T. Beta-endorphin-induced changes in schizophrenic and depressed patients. **Arch Gen Psychiatry**, 34, 1111-1113, 1977.

KORNHUBER, J., WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. **Biol Psychiatry**, 41, 135-144, 1997.

KRISHNASWAMY, K., MADHAVAN, NAIR. K. Importance of folate in human nutrition. **Br J Nutr.**, 85 Suppl 2:S115-24, 2001.

KRUMAN, I.I., CULMSEE, C., CHAN, S.L., KRUMAN, Y., GUO, Z., PENIX, L., MATTSON, M.P. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. **J Neurosci.**, 20, 6920-6926, 2000.

KRUMAN, I.I., KUMARAVEL, T.S., LOHANI, A., PEDERSEN, W.A., CUTLER, R.G., KRUMAN, Y., ET AL. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. **J Neurosci.**, 22,1752-62, 2002.

KULKARNI, S.K., DHIR, A. Possible involvement of L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in the antidepressant activity of berberine chloride. **Eur J Pharmacol.**, 569, 77-83, 2007.

KULOGLU, M., USTUNDAG, B., ATMACA, M., CANATAN, H., TEZCAN, A.E., CINKILINC, N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Cell Biochem Funct.**, 20,171-175, 2002.

LI, R., EL-MALLAKH, R.S., HARRISON, L., CHANGARIS, D.G., LEVY, R.S. Lithium prevents ouabain-induced behavioral changes. Toward an animal model for manic depression. **Mol Chem Neuropathol.**, 31, 65-72, 1997.

LIMA, M.S., TASSI, J., NOVO, I.P., MARI, J.J. Epidemiologia do transtorno bipolar. **Rev Psiq Clín.** 32, 15-20, 2005.

LOONEY, S.W., EL-MALLAKH, R.S. Meta-analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. **Depress Anxiety**, 5, 53-65, 1997.

LU, X.Y., KIM, C.S., FRAZER, A., ZHANG, W. Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci.**, 103, 1593-1598, 2006.

LUCOCK, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Mol Genet Metab.**, 71, 121-138, 2000.

MACHADO, D.G., KASTER, M.P., BINFARÉ, R.W., DIAS, M., SANTOS, A.R., PIZZOLATTI, M.G., BRIGHENTE, I.M., RODRIGUES, A.L. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, 31, 421-428, 2007.

MACHADO-VIEIRA, R., ANDREAZZA, A.C., VIALE, C.I., ZANATTO, V., CERESER, V. J.R., DA SILVA, VARGAS, R., KAPCZINSKI, F., PORTELA, L.V., SOUZA, D.O., SALVADOR, M., GENTIL, V.. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. **Neurosci Lett.**, 421, 33-36, 2007.

MACHADO-VIEIRA, R., SOARES, J.C. Transtornos de humor refratários a tratamento. **Rev Bras Psiquiatr.**, 29 suppl 2 , 2007.

MALBERG, J.E., BLENDY, J.A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. **Trends Pharmacol Sci.**, 26, 631-638, 2005.

MALER, J.M., SEIFER, T.W., HUTHER, G., WILTFANG, J., RUTHER, E., KORNHUBER, J., ET AL. Homocysteine induces cell death of rat astrocytes in vitro. **Neurosci Lett.**, 347, 85-88, 2003.

MANIER, D.H., SHELTON, R.C., ELLIS, T.C., PETERSON, C.S., EIRING, A., SULSER, F. Human fibroblasts as a relevant model to study signal transduction in affective disorders. **J Affect Disord.**, 61, 51-58, 2000.

MANJI, H.K. e CHEN, G.K.C. MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. **Mol Psychiatry**, 1: S46-S56, 2002.

MANJI, H.K., CHEN, G., HSIAO, J.K., RISBY, E.D., MASANA, M.I., POTTER, W.Z. Regulation of signal transduction pathways by mood-stabilizing agents: implications for the delayed onset of therapeutic efficacy. **J Clin Psychiatry**, 57 Suppl 13: 34-46, 1996.

MANJI, H.K., DREVETS, W.P., CHARMEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nature Med.**, 7, 541-547, 2001.

MANJI, H.K., MCNAMARA, R., CHEN, G., LENOX, R.H. Signalling pathways in the brain: cellular transduction of mood stabilisation in the treatment of manic-depressive illness. **Aust N Z J Psychiatry**, 33 Suppl:S65-83, 1999.

MANJI, H.K., MOORE, G.J., RAJKOWSKA, G., CHEN, G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. **Mol Psychiatry**, 5: 578-593, 2000.

MANN, J.J., MALON, E.K.M., DIEHL, D.J., PEREL, J., COOPRE, T.B., MINTUN, M.A. Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. **Am J Psych.**, 153, 174-181, 1996.

MANN, J.J., MCBRIDE, P.A., MALONE, K.M., DEMEO, M., KEILP, J. Blunted serotonergic responsivity in depressed inpatients. **Neuropsychopharmacology**, 13, 53-64, 1995.

MASON, J. **Folate status: effects on carcinogenesis**. In: BAILEY, L.B. (ed). Folate in Health and Disease. New York, NY: Marcel Dekker, 1995. p.329-361.

MATOS E SOUZA, F.G. Tratamento de Transtorno Bipolar: Eutimia. **Rev Psiquiatr Clin.**, 32, suppl.1, 63-70, 2005.

MATTÉ, C., DURIGON, E., STEFANELLO, F.M., CIPRIANI, F., WAJNER, M., WYSE, A.T. Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. **Int J Dev Neurosci.**, 24, 3-8, 2006.

MATTSON, M.P., SHEA, T.B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Neuroscience**, 26, 137-146, 2003.

MAURA, G., MARCOLI, M., PEPICELLI, O., ROSU, C., VIOLA, C., RAITERI, M. Serotonin inhibition of the NMDA receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in human neocortex slices: involvement of 5-HT(2C) and 5-HT(1A) receptors. **Br J Pharmacol.**, 130, 1853-1858, 2000.

MAZE, M., FUJINAGA, M. Recent advances in understanding the actions and toxicity of nitrous oxide. **Anaesthesia**, 55,311-314, 2000.

MCARTHUR, R., BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav.**, 84, 436-452, 2006.

- MCEWEN, B.S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu Rev Neurosci.**, 22, 105-122, 1999.
- MCKINNEY, W.T. J.R., BUNNEY, W.E. J.R. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research **Arch Gen Psychiatry**, 240-248, 1969.
- McNULTY, H. Folate requirements for health in different population groups. **Brit J Biomed Sci.**, 52, 110-119, 1995.
- MERCIER, G., LENNON, A.M., RENOUF, B., DESSOUROUX, A., RAMAUGÉ, M., COURTIN, F., PIERRE, M. MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. **J Mol Neurosci.**, 24, 207-216, 2004.
- MILLAN, M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur J Pharmacol.**, 500, 371-384, 2004.
- MINEUR, Y.S., SOMENZI, O., PICCIOTTO, M.R. Cytisine, a partial agonist of high-affinity nicotinic acetylcholine receptors, has antidepressant-like properties in male C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, 52, 1256-62, 2007.
- MOLINOFF, P.B., WILLIAMS, K., PRITCHETT, D.B., ZHONG, J. Molecular pharmacology of NMDA receptors: modulatory role of NR2 subunits. **Prog Brain Res.**, 39-45, 1994.
- MONCADA, S. Nitric oxide. **J Hypertens Suppl.**, 12, S35-39, 1994.
- MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol.**, 38, 1709-1715, 1989.
- MOSES-KOLKO, E.L., PRICE, J.C., THASE, M.E., MELTZER, C.C., KUPFER, D.J., MATHIS, C.A., BOGERS, W.D., BERMAN, S.R., HOUCK, P.R., SCHNEIDER, T.N., DREVETS, W.C. Measurement of 5-HT_{1A} receptor binding in depressed adults before and after antidepressant drug treatment using positron emission tomography and [¹¹C]WAY-100635. **Synapse**, 61, 523-530, 2007.
- MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B., BERGHÖFER, A., MICHAEL, B. Bipolar disorder. **Lancet**, 359, 241-247, 2002.
- MURRAY, C.J.L., LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 349, 1498-1504, 1997.
- NAIR, A., VAIDYA, V.A. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? **J Biosci.**, 31, 423-434, 2006.
- NARDI, AE. Depressão no Ciclo da Vida. **Rev Bras Psiquiatr.**, 22, 151-152, 2000.

NEMEROFF, C.B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res.**, 41, 189-206, 2006.

NEMEROFF, C.B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry.**, 1, 336-42, 1996.

NEMEROFF, C.B., OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neurosci.**, 5, 1068-1070, 2002.

NESTLER, E.J., BARROT, M, DILEONE, R.J., EISCH, A. J., GOLD, S.J., MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, 34, 13-25, 2002a.

NESTLER, E.J., CARLEZON, W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, 59, 1151-1159, 2006.

NESTLER, E.J., GOULD, E., MANJI, H., BUCAN, M., DUMAN, R.S., GERSHENFELD, H.K., HEN, R., KOESTER, S., LEDERHENDLER, I., MEANEY, M.J., ROBBINS, T., WINSKY, L., ZALCMAN, S. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**, 52, 503-528, 2002b.

NG, F., BERK, M., DEAN, O., BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol.**, 21, 1-26, 2008.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, 95, 351-358, 1979.

OKUMA, T. Effects of carbamazepine and lithium on affective disorders. **Neuropsychobiology**, 27, 138-145, 1993.

OZCAN, M.E., GULEC, M., OZEROL, E., POLAT, R., AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **Int Clin Psychopharmacol.**, 19, 89-95, 2004.

PAGE, M.E., DETKE, M.J., DALVI, A., KIRBY, L.G., LUCKI, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology**, 147, 162-7, 1999.

PALMADA, M., CENTELLES, J.J. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. **Front Biosci.**, 3, 701-718, 1998.

PANDEY, G.N., DWIVEDI, Y., REN, X., RIZAVI, H.S., ROBERTS, R.C., CONLEY, R.R., TAMMINGA, C. Altered expression and phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in postmortem brain of suicide victims with or without depression. **J Psychiatry Res.**, 37, 421-32, 2003.

PANDEY, G.N., DWIVEDI, Y., RIZAVI, H.S., REN, X., CONLEY, R.R. Decreased catalytic activity and expression of protein kinase C isozymes in teenage suicide victims: a postmortem brain study. **Arch Gen Psychiatry**, 61, 685-93, 2004.

PARKER, P.J., MURRAY-RUST, J. PKC et a glance. **J Cell Sci.**, 117, 131-132, 2004.

PARSEY, R.V., HASTINGS, R.S., OQUENDO, M.A., HUANG, Y.Y., SIMPSON, N., ARCEMENT, J., HUANG, Y., OGDEN, R.T., VAN HEERTUM, R.L., ARANGO, V., MANN, J.J. Lower serotonin transporter binding potential in the human brain during major depressive episodes. **Am J Psychiatry**, 163, 52-58, 2006.

PAUL, I.A., SKOLNICK, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. **Ann N Y Acad Sci.**, 1003, 250-272, 2003.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, 4th Edn. Academic Press, San Diego, 1998.

PERERA, T.D., COPLAN, J.D., LISANBY, S.H., LIPIRA, C.M., ARIF, M., CARPIO, C., SPITZER, G., SANTARELLI, L., SCHARF, B., HEN, R., ROSOKLIJA, G., SACKEIM, H.A., DWORK, A.J. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. **J Neurosci.**, 27, 4894-4901, 2007.

PERRY, I.J., REFSUM, H., MORRIS, R.W., EBRAHIM, S.B., UELAND, P.M., SHAPER, A.G. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. **Lancet**, 346, 1395-1398, 1995.

PETRIE, R.X.A., REID, I.C., STEWART, C.A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic, plasticity, and depressive disorder. A critical review. **Pharmacol Therap.**, 87, 11-25, 2000.

PINI, L.A., SANDRINI, M., VITALE, G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. **Eur J Pharmacol.**, 308, 31-40, 1996.

PITTALUGA, A., RAITERI, L., LONGORDO, F., LUCCINI, E., BARBIERO, V.S., RACAGNI, G., POPOLI, M., RAITERI, M. Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus. **Neuropharmacology**, 53, 27-36, 2007.

PITTENGER, C., DUMAN, R.S. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, 33, 88-109, 2008.

POOLE, A.W., PULA, G., HERS, I., CROSBY, D., JONES, M.L. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. **Trends Pharmacol Sci.**, 25, 528-535, 2004.

POPOLI, M., BRUNELLO, N., PEREZ, J., RAEAGNI, G. Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. **J Neurochem.**, 74, 21-33, 2000.

POPOLI, M., GENNARELLI, M., RACAGNI, G. Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. **Bipolar Disord.**, 4, 166-182, 2002.

POPOLI, M., MORI, S., BRUNELLO, N., PEREZ, J., GENNARELLI, M., RACAGNI, G. Serine/threonine kinases as molecular targets of antidepressants: implications for pharmacological treatment and pathophysiology of affective disorders. **Pharmacol Ther.**, 89, 149-170, 2001.

PORSOLT, R.D. Animal model of depression. **Biomedicine**, 30, 139-140, 1979.

PORSOLT, R.D., BERTIN, A., JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, 229, 327-336, 1977.

POST, R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psych.**, 149, 999-1010, 1992.

PRANGE, A.J. JR, WILSON, I.C., LYNN, C.W., ALLTOP, L.B., STIKELEATHER, R.A. L-tryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. **Arch Gen Psychiatry**, 30, 56-62, 1974.

PRICE, L.H., HENINGER, G.R. Lithium in the treatment of mood disorders. **N Engl J Med.**, 331, 591-598, 1994.

RAMAEKERS, V., BLAU, N. Cerebral folate deficiency. **Dev Med Child Neurol.**, 46, 843-51, 2004.

RANJEKAR, P.K., HINGE, A., HEGDE, M.V., GHATE, M., KALE, A., SITASAWAD, S., WAGH, U.V., DEBSIKDAR, V.B., MAHADIK, S.P. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. **Psychiatry Res.**, 121, 109-122, 2003.

REDROBE, J.P, BOURIN, M. Partial role of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. **Eur J Pharmacol.**, 325, 129-35, 1997.

REDROBE, J.P., BOURIN, M., COLOMBEL, M.C., BAKER, G.B. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, 138, 1-8, 1998.

REYNOLDS, E.H. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 72, 567-571, 2002.

REZK, B.M., HAENEN, G.R., VAN, D.E.R., VIJGH, W.J., BAST, A. Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore. **FEBS Letters**, 555, 601-605, 2003.

RICCI, L.C., WELLMAN, M.M. Monoamines: biochemical markers of suicide? **Clin Psychol.**, 46, 106-116, 1999.

RICHELSON E. Pharmacology of antidepressants. **Mayo Clin Proc.**, 76, 511-527, 2001.

RICHELSON, E. Basic neuropharmacology of antidepressants relevant to the pharmacotherapy of depression. **Clin Cornerstone**, 4, 17-30, 1999.

RODRIGUES, A.L., DA SILVA, G.L., MATEUSSI, A.S., FERNANDES, E.S., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.**, 70, 1347-1358, 2002.

ROMERO, L., HERVÁS, I., ARTIGAS, F. The 5-HT_{1A} antagonist WAY-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of serotonergic antidepressants in rat brain. **Neurosci Lett.**, 219, 123-126, 1996.

ROSA, A.O., LIN, J., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R., RODRIGUES A.L. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behav Brain Res.**, 144, 87-93, 2003.

ROSE, A.M., MELLETT, B.J., VALDES JR., R., KLEINMAN, J.E., HERMANN, M.M., LI, R., EL-MALLAKH, R.S. Alpha₂ isoform of the Na_vKATPase is reduced in temporal cortex of bipolar individuals. **Biol Psychiatry**, 44, 892-897, 1998.

RUKTANONCHAI, D.J., EL-MALLAKH, R.S., LI, R., LEVY, R.S. Persistent hyperactivity following a single intracerebroventricular dose of ouabain. **Physiol Behav.**, 63, 403-406, 1998.

SABHARANJAK, S., MAYOR, S. Folate receptor endocytosis and trafficking. **Adv Drug Deliv Rev.**, 56, 1099-109, 2004.

SACHDEV, P. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. **Rev Bras Psiquiatr.**, 26, 50-56, 2004.

SAITOH, A., KIMURA, Y., SUZUKI, T., KAWAI, K., NAGASE, H., KAMEI, J. Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective delta-opioid agonist, in behavioral models in rodents. **J Pharmacol Sci.**, 95, 374-380, 2004.

SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. **J Neurosci.**, 6, 2240-2244, 1986.

SAPOLSKY, R.M., ROMERO, L.M., MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr Rev.**, 21, 55-89, 2000.

SAVAS, H.A., GERGERLIOGLU, H.S., ARMUTCU, F., HERKEN, H., YILMAZ, H.R., KOCOGLU, E., SELEK, S., TUTKUN, H., ZOROGLU, S.S., AKYOL, O. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. **World J Biol Psychiatry**, 7, 51-5, 2006.

SAWYNOK, J., ESSER, M.J., REID, A.R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. **J Psychiatry Neurosci**, 26, 21-29, 2001.

SCHAEFFER, H.J., WEBER, M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Mol Cell Biol**, 19, 2435-2444, 1999.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, 122, 509-522, 1965.

SCHREIBER, S., BLEICH, A., PICK, C.G. Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects--a possible opioid involvement in severe depression? **J Mol Neurosci**, 18, 143-149, 2002.

SCOTT, J.M., WEIR, D.G. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. **J Cardiovasc Risk**, 5, 223-227, 1998.

SHALTIEL, G., CHEN, G., MANJI, H.K. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Curr Opin Pharmacol**, 7, 22-26, 2007.

SHAO, L., YOUNG, L.T., WANG, J.F. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. **Biol Psychiatry**, 58, 879-884, 2005.

SHASTRY, B.S. Bipolar disorder: an update. **Neurochem Int**, 46, 273-279, 2005.

SHELTON, R.C., MANIER, D.H., PETERSON, C.S., ELLIS, T.C., SULSER, F. Cyclic AMP-dependent protein kinase in subtypes of major depression and normal volunteers. **Int J Neuropsychopharmacol**, 2, 187-192, 1999.

SHELTON, R.C., MANIER, D.H., SULSER, F. cAMP-dependent protein kinase activity in major depression. **Am J Psychiatry**, 153, 1037-1042, 1996.

SHIAH, I.S., YATHAM, L.N. Serotonin in mania and in the mechanism of action of mood stabilizers: a review of clinical studies. **Bipolar Disord**, 2, 77-92, 2000.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, 82, 291-295, 1997.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol**, 375, 31-40, 1999.

SKOLNICK, P. Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. **Amino Acids**, 23, 153-159, 2002.

SMITH, J.C., WHITTON, P.S. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. **Neurosci Lett.**, 291, 5-8, 2000.

SNYDER, S.H. Nitric oxide and neurons. **Curr Opin Neurobiol.**, 2, 323-327, 1992.

SPROUSE, J., BRASELTON, J., REYNOLDS, L., CLARKE, T., ROLLEMA, H. Consequences of 5-HT re-uptake blockade on postsynaptic 5-HT_{1A} receptor activation: an electrophysiological and neurochemical study in guinea pig dorsal raphe and hippocampus. **Ann N Y Acad Sci.**, 861, 272-273, 1998.

STAHL, S.M., GRADY, M.M. Differences in mechanism of action between current and future antidepressants. **J Clin Psychiatry**, 64 Suppl 13, 13-7, 2003.

STARKMAN, M.N., GEBARSKI, S.S., BERENT, S., SCHTEINGART, D.E. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. **Biol Psychiatry**, 32, 756-765, 1992.

STERU, L., CHERMAT, R., THIERRY, B., SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, 85, 367-370, 1985.

STOLL, A.L., RUETER, S. Treatment augmentation with opiates in severe and refractory major depression. **Am J Psychiatry**, 156, 2017, 1999.

SZASZ, B.K., MIKE, A., KAROLY, R., GEREVICH, Z., ILLES, P., VIZI, E.S., KISS, J.P. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. **Biol Psychiatry**, 62, 1303-1309, 2007.

TAYLOR, C., FRICKER, A.D., DEVI, L. A., GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathway. **Cell Signal.**, 17, 549-557, 2005.

TAYLOR, M.J., CARNEY, S.M., GOODWIN, G.M., GEDDES, J.R. Folate for depressive disorders: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Psychopharmacol.**, 18, 251-256, 2004.

TEJEDOR-REAL, P., MICÓ, J.A., MALDONADO, R., ROQUES, B.P., GIBERT-RAHOLA, J. Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. **Pharmacol Biochem Behav.**, 52, 145-152, 1995.

TEJEDOR-REAL, P., MICÓ, J.A., SMADJA, C., MALDONADO, R., ROQUES, B.P., GILBERT-RAHOLA, J. Involvement of delta-opioid receptors in the effects induced by endogenous enkephalins on learned helplessness model. **Eur J Pharmacol.**, 354, 1-7, 1998.

TENG, C.T., HUMES, E.C., DEMETRIO, F.N. Depressão e comorbidade clínicas. **Rev Psiquiatr Clín.**, 32, 149-159, 2005.

TIEMEIER, H., VAN TUIJL, H.R., HOFMAN, A., MEIJER, J., KILIAAN, A.J., BRETELER, M.M. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. **Am J Psychiatry**, 159, 2099-101, 2002.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem.**, 27, 502-522, 1969.

TORREGROSSA, M.M., JUTKIEWICZ, E.M., MOSBERG, H.I., BALBONI, G., WATSON, S.J., WOODS, J.H. Peptidic delta opioid receptor agonists produce antidepressant-like effects in the forced swim test and regulate BDNF mRNA expression in rats. **Brain Res.**, 1069, 172-181, 2006.

TROEN, A.M. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 29, 1140-1151, 2005.

VAIDYA, V.A., DUMAN, R.S. Depression--emerging insights from neurobiology. **Br Med Bull.**, 57, 1-79, 2001.

VAN OEKELEN, D., LUYTEN, W.H., LEYSEN, J.E. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. **Life Sci.**, 72, 2429-249, 2003.

VERGURA, R., BALBONI, G., SPAGNOLO, B., GAVIOLI, E., LAMBERT, D.G., MCDONALD, J., TRAPPELLA, C., LAZARUS, L.H., REGOLI, D., GUERRINI, R., SALVADORI, S., CALÓ, G. Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂)-COOH-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist. **Peptides**, 29, 93-103, 2008.

VILPOUX, C., CARPENTIER, C., LEROUX-NICOLLET, I., NAUDON, L., COSTENTIN, J. Differential effects of chronic antidepressant treatments on micro- and delta-opioid receptors in rat brain. **Eur J Pharmacol.**, 443, 85-93, 2002.

VOLKE, V., WEGENER, G., BOURIN, M., VASAR, E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behav Brain Res.**, 140, 141-147, 2003.

WAGNER, C. **Biochemical role of folate.** In: BAILEY, L.B. (ed). Cellular metabolism. Folate in Health and Disease. New York: Marcel Dekker, 1995. p.23-42.

WANG, J.F., AZZAM, J.E., YOUNG, L.T. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. **Neuroscience**, 116, 485-9, 2003.

WATSON, S., GALLAGHER, P., RITCHIE, J.C., FERRIER, I.N., YOUNG, A.H. Hypothalamic pituitary adrenal axis function in patients with bipolar disorder **Br J Psychiatry**, 184, 496-502, 2004.

WEGENER, G., VOLKE, V., HARVEY, B.H., ROSENBERG, R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. **Brain Res.**, 959, 128-34, 2003.

WELLS, K.B., STEWART, A., HAYS, R.D., BURMAN MA, ROGERS W, DANIELS M ET AL. The functioning and well-being of depressed patients: results from the medical outcomes study. **JAMA**, 262, 916-919, 1989.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, 77, 325-332, 1981.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, 83:1-16, 1984.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, 134, 319-29, 1997.

WONG, M., LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Rev.**, 2, 343-351, 2001.

WORK GROUP ON BIPOLAR DISORDER. Practice Guidelines for the Treatment of Patients with Bipolar Disorder. In: **American Psychiatric Association** (eds.). Practice Guidelines for the Treatment of Psychiatric Disorders. Compendium 2004. American Psychiatric Association, Arlington, Virginia, pp. 525-612, 2004.

YALCIN, I., AKSU, F., BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **Eur J Pharmacol.**, 514, 165-74, 2005.

YATHAM, L.N., LIDDLE, P.F., DENNIE, J., SHIAH, I.S., ADAM, M.J., LANE, C.J., LAM, R.W., RUTH, T.J. Decrease in brain serotonin 2 receptor binding in patients with major depression following desipramine treatment: a positron emission tomography study with fluorine-18-labeled setoperone. **Arch Gen Psychiatry**, 56, 705-711, 1999.

YILDIZ, F., ERDEN, B.F., ULAK, G., UTKAN, T., GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, 149, 41-44, 2000.

YOUNG, J.W., MINASSIAN, A., PAULUS, M.P., GEYER, M.A., PERRY, W. A reverse-translational approach to bipolar disorder: Rodent and human studies in the Behavioral Pattern Monitor. **Neurosci Biobehav Rev.**, 31, 882-896, 2007.

YOUNG, L.T., WARSH, J.J., KISH, S.J., SHANNAK, K., HORNYKEIWICZ, O. Reduced brain 5-HT and elevated NE turnover and metabolites in bipolar affective disorder. **Biol Psychiatry**, 35, 121-127, 1994.

ZARATE, C.A. DU, J, QUIROZ, J., GRAY, N.A., DENICOFF, K.D., SINGH, J., CHARNEY, D.S., MANJI, H.K. Regulation of cellular plasticity cascades in the

pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. **Ann N Y Acad Sci.**, 1003, 273-291, 2003.

ZARATE, C.A., QUIROZ, J., PAYNE, J., MANJI, H.K. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. **Psychopharmacol Bull.**, 36, 35-83, 2002.

ZOMKOWSKI, A.D., SANTOS, A.R., RODRIGUES, A.L. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. **Neurosci Lett.**, 381, 279-283, 2005.

ZOMKOWSKI, A.D.E., HAMMES, L., LIN, J., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES ALS. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **Neuroreport**, 13, 387-391, 2002.

ZOMKOWSKI, A.D.E., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.**, 1023, 253-263, 2004.