

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

*Tese de Doutorado*

**Alterações da Neurotrofina-3 em Pacientes com Transtorno de  
Humor Bipolar e em Modelo Animal de Mania**

Aluno: Julio Cesar Walz

Orientador: Prof. Dr. Flávio Kapczinski

Porto Alegre, dezembro de 2006

Catálogo-na-Publicação

W242 Walz, Julio Cesar

Alterações da neurotrofina-3 em pacientes com transtorno do humor bipolar e em modelo animal de mania / Julio César Walz. – 2006.  
96 f.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Kapczinski.

1. Transtornos do humor 2. Transtorno bipolar 3. Transtorno de humor bipolar 4. Neurotrofina 3 I. Kapczinski, Flávio II.  
Título

NLM WM 171

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| Agradecimentos.....  | 2  |
| Resumo.....  | 5  |
| Lista de Abreviaturas.....   | 6  |
| Revisão Bibliográfica .....  | 8  |
| 1. Descrição Clínica .....   | 8  |
| 2. Fisiopatologia .....  | 10 |
| 3. Neurotrofinas .....   | 15 |
| 3.1 A Neurotrofina-3 .....   | 21 |
| 4. Estabilizadores de Humor .....  | 24 |
| Objetivos .....  | 26 |
| Referências Bibliográficas .....   | 27 |
| 1º. Artigo Inglês: Serum neurotrophin-3 is increased during manic and depressive episodes in bipolar disorder..... | 37 |
| 1º. Artigo Traduzido .....   | 49 |
| 2º. Artigo Serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in animal model of mania .....                              | 60 |
| 2º. Artigo Níveis Séricos e Hipocampais de Neurotrofina-3 em modelo animal de mania .....                          | 76 |
| Discussão.....   | 91 |

## AGRADECIMENTOS

**“Sou o guri que pode ser divertir com o invisível”**

**James Joyce**

**“Na escuridão nascem mundos”**

**Rubem Alves**

Não tenho dúvidas. Sim, não tenho dúvidas.

Eis a primeira: A formalidade da tese acabou. O conhecimento se abriu. O mundo se ampliou. Falta quase tudo; sigamos investigando...

A segunda dúvida que não tenho: a generosidade e a solidariedade existem. A começar pelo Flávio (Prof. Dr. Flávio Kapczinski). O “chefe” que dá gosto “obedecer”. Segue daqui meu abraço de gratidão pela acolhida e no exemplo de como a ciência pode ser amorosa e eficiente. E de como um grupo tão diverso, quando bem conduzido, consegue ser alegre e solidário em meio às diferenças.

A terceira: São tantos que deveriam ser os primeiros autores... Mas vou enumerar e se alguém acha que falei pouco pode gritar que corro para dar um abraço merecido.

Keila (Cereser), que me conheceu com a seguinte frase: *“Tá demais estes números. Vamos tomar um café”*. Assim começamos nosso convívio nas aulas de estatística como preparação para a prova da Fundação. E até hoje sempre estavas por perto, com tuas idéias, tua disposição e cuidado. *“Julio, sempre que precisares, dá um grito”*. E quando “gritei” (muitas vezes) estavas aí rápida e amorosamente. Muito obrigado e sem palavras suficientes para tudo o que fizestes.

Tina (Ana Cristina Andrezza), nossa bioquímica, estatística, assessora e quase tudo o que precisarmos de plantão. E contigo descobri como o sangue se

torna número e acaba no SPSS... Ah, e vira gráfico e termina como um P. E imaginem: geralmente um P “liiiiindooooo....” E para mostrar que isto de fato é lindo, só uma apaixonada.

Alice (Alice Cacilhas), chegou de mansinho, se aprumando e de repente juntamos o *pan universal* receptor P75 com o promíscuo NT-3 nas mesas de bares com aquela loira gelada, ou vinho, que deu a liga pra tese. Aliás, levamos a Keila para este caminho (outros achavam que não dá pra fazer ciência em bar.... mas, mudaram de idéia). Aí fez graça. O que era esquisito se tornou até psicanalítico, e estudamos por associação. Como o efeito de um bom tratamento, foram momentos impagáveis.

Benicio (Frey) correspondente mundial. O amigo que arredonda as idéias, suscita novas questões, aumenta as informações. Alguém que sempre acrescenta e é destemido em seus projetos. Siga meu novo e solidário amigo.

Adriane (Rosa), agora na Espanha, começamos na coleta de controles. Mas antes disso, iniciou-nos na discussão do GDNF e nos deu novos horizontes. Sempre vibrante, organizou a infra da coleta do material biológico. Tomamos uns bons cafés quando recebíamos muitos “nãos”.

Gazalle (Fernando), amigo que trouxe grandes momentos epidemiológicos em nosso processo como grupo. Além disto, um clínico generoso e sempre disposto no cuidado com nossos pacientes. Valeu parceiro.

Laura (Stertz) cuidadosa com todo e qualquer material tornou-se a nossa guardiã chefe do material e de muitos experimentos. Obrigado querida.

Leonardo colega aprendiz na coleta dos controles, bate-papos nos intervalos, discussões iniciais, dicionário médico para um psicólogo leigo em medicina. Enfim, um gentleman no coleguismo. Bons estudos meu amigo.

Sabrina e Fernanda fizeram muito do trabalho que quase não se vê, mas que sem ele, nada andaria. Sigam suas conquistas.

E lateralmente, em outras pesquisas ou residência, tive a companhia sempre interessada do Fabiano, Larriany, Mauricio, Juliana, Betina, Denise, Julia, Gislaine, Rita e a Márcia Sant'Anna. A vocês um grande e solidário abraço.

A Dra. Ailda Santin sempre atenciosa com as pesquisas e cuidadosa com o PROTAHBI.

A Dra. Sandra Fuchs, dedicada mestre, que mostrou um imenso interesse em que seus alunos aprendam a pensar e a pesquisar. Foram aulas inesquecíveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS, pelo ineditismo em fazer ciência interdisciplinar e por toda a estrutura de aperfeiçoamento na pesquisa médica em nosso Estado.

Ao Roger Walz, conhecido de muitos aqui, meu irmão, e que me trouxe a sugestão de falar com o Flávio e propôs o Príon para início da conversa. O Príon acabou sendo trocado pelo NT-3, mas acho que ainda está latejando. Obrigado Roger pela tua ousadia e empreendedorismo.

Por fim ou por começo, à Magda querida companheira que facilitou muito meus caminhos neste processo. Rimos muito, aprendemos bastante e sempre que eu saía da casinha o pedido de retorno era com muito jeito. O Thomas (11 anos) vez por outra pedia umas conversas a noite querendo saber um pouco disto que tanto eu lia e escrevia. E o Franco (7 anos) que soube medir também com gentileza os pedidos para me desafiar no vídeo game. A vocês três, sempre curiosos em conhecer comigo, um grande beijo.

## RESUMO

As neurotrofinas têm sido relacionadas com inúmeros aspectos fisiológicos incluindo neuritogênese, neurogênese e potenciação sináptica tanto em neurônios imaturos como pós-natais. Da mesma forma, estas substâncias tem sido implicadas como potencialmente envolvidas em transtornos neurológicos e psiquiátricos, entre os quais os chamados transtornos afetivos e, em nosso caso, especificamente, o Transtorno de Humor Bipolar (THB).

Este estudo é o primeiro experimento que avalia os níveis da Neurotrofina-3 (NT-3) em pacientes com THB e no modelo animal de mania. E segue a linha de pesquisa das alterações fisiopatológicas no THB do grupo de investigação do Laboratório de Psiquiatria Experimental, coordenada pelo Prof. Dr. Flávio Kapczinski, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Para avaliarmos as possíveis alterações dos níveis de NT-3 em pacientes, coletamos sangue destes em estado maníaco, deprimido e eutímico e comparamos com controles hígidos para doença neurológica e psiquiátrica e história familiar de doença neurológica e psiquiátrica. Para o modelo animal utilizamos o modelo desenvolvido pelo Dr. Benicio Frey (nosso grupo), valendo-se da D-ANF como indutor de mania. Neste modelo testamos tanto o uso preventivo como reversivo de Li e VPT sobre o NT-3, comparando com Solução Salina e ANF.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPH = *d-amphetamine*

ANF = d-anfetamina

BAPTA =

BD = *bipolar disorder*

BDNF = *brain-derived neurotrophic factor*

CGI = *clinical global impression*

CPF = cortex pré-frontal

CREB = *cAMP response element binding*

DA = dopamine

GABA =

GAF = *global assessment of functioning*

GDNF = *glial cell line-derived neurotrophic factor*

GSK-3 $\beta$  = *glycogen synthase kinase 3-beta*

HDRS = hamilton depression rating scale

HIPO = hipocampo

HIPPO = *hippocampus*

Li = lítio

NT-3 = neurotrofina-3

NGF = *nerve growth factor*

OD = optical density



PET = tomografia por emissão de pósitrons

SOD = superóxido dismutase

SPSC = *spontaneous postsynaptic currents*

THB = transtorno de humor bipolar

TBARS = *thiobarbituric acid reactive species*

TrKA = Tirosina Kinase A

TrKB = Tirosina Kinase B

TKC = Tirosina Kinase C

VPT = ácido valpróico

YMRS = Young Manic Rating Scale

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. Descrição Clínica**

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) acomete de 1-3% da população em todo o mundo, e está associado a um alto índice de suicídio e desemprego (Weissman et al., 1996; Grant et al., 2005; Müller-Oerlinghausen, Berhofer e Bauer 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde, o THB é considerado uma das dez principais causas de incapacitação (Lopez e Murray, 1998). O curso clínico do THB é crônico, usualmente caracterizado por períodos de exacerbação dos sintomas (episódios agudos) intercalados por períodos subsindrômicos e períodos de remissão (eutimia). Em um estudo de seguimento, que acompanhou pacientes bipolares tipo I por um período médio de 13 anos, se observou que os pacientes permaneceram metade deste período sintomáticos (Judd et al., 2002). Além disto, observa-se que a persistência de sintomas subsindrômicos está associada a um maior risco de reagudização da doença (Perlis et al., 2006) e maior índice de incapacitação (Judd et al., 2005).

Do ponto de vista do diagnóstico, os autores pressupõem que a ocorrência de pelo menos um episódio maníaco ou hipomaníaco durante a vida é suficiente para a identificação do THB, na qual a presença de episódio maníaco confere o diagnóstico de THB tipo I, enquanto a presença de episódio hipomaníaco confere o diagnóstico de THB tipo II (Belmaker, 2004). A presença de um episódio maníaco é definida por uma elevação persistente do humor (humor eufórico ou

irritável), acompanhado por pelo menos 3 dos seguintes sintomas (4 se humor irritável):

- a) aumento da autoconfiança ou grandiosidade;
- b) taquilalia ou pressão por falar;
- c) diminuição da necessidade do sono;
- d) pensamento acelerado ou fuga de idéias;
- e) distraibilidade;
- f) alteração do comportamento dirigido para atividades prazerosas, freqüentemente imprudentes ou perigosas;
- g) ou agitação psicomotora.

Além disso, o episódio deve ser suficientemente grave para causar prejuízo significativo no âmbito familiar, social ou ocupacional, ou necessidade de hospitalização ou ter presença de sintomas psicóticos. Devido ao seu curso crônico e à freqüente reincidência e gravidade dos sintomas de humor, o tratamento do THB atualmente baseia-se no manejo dos episódios agudos e no tratamento de manutenção como prevenção para ocorrência de novos episódios (Yatham et al., 2005). Além dos episódios serem incapacitantes, estudos mostram que a demora no diagnóstico e o número maior de crises refletem ou prognosticam uma piora cognitiva e clínica geral do paciente bipolar. Além disto, estudos ainda indicam que alterações neuroquímicas induzidas pela mania estão associadas ao surgimento de efeitos lesionais em células neurais (Post et al., 1982; Friedman et al., 1993; Johnston-Wilson et al., 2000). Ou seja, a conduta para que os pacientes se mantenham eutímicos o maior tempo possível, tem um

efeito de proteção neuronal, na medida em que durante as fases maníacas e depressivas os mesmos estão mais suscetíveis aos efeitos de danos ao DNA (Andreazza et al., 2006)

Entretanto, os índices de recorrência e de resistência aos medicamentos de primeira linha são bastante elevados. Dois estudos que avaliaram indivíduos bipolares tratados em instituições acadêmicas demonstraram que uma alta porcentagem dos pacientes permanece sintomática, mesmo quando “adequadamente tratados” (Post et al., 2003; Dennehy et al., 2005). Embora os medicamentos de última geração possuam um melhor perfil de tolerabilidade e segurança em relação aos tradicionais, muito pouco se adicionou, do ponto de vista da eficácia, em relação aos primeiros medicamentos (Castrén, 2005). Possivelmente este pequeno avanço no tratamento do THB se deve ao pouco conhecimento que ainda se tem acerca dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste transtorno (Zarate, Singh e Manji 2006).

## **2. Fisiopatologia**

Apesar do grande impacto e incapacitação que o THB causa na população, pouco ainda se sabe sobre a sua etiologia e neurobiologia. Trata-se de um quadro complexo de interação entre os múltiplos genes que causam suscetibilidade, bem como a relação destes com os fatores ambientais (Shaltiel, Chen e Manji 2006). As bases biológicas do THB incluem estudos relacionados à genética, às vias neuro-hormonais, neurotransmissão, vias de transcrição de sinal, regulação da

expressão gênica, estresse oxidativo, entre outros. Estudos genéticos têm sugerido, fortemente, que a patofisiologia pode ser explicada, pelo menos em parte, por fatores genéticos (Lenox, Gould e Manji 2002). Existem diversas evidências mostrando o envolvimento das espécies reativas do oxigênio (ERO) em diversas patologias, especialmente nos transtornos neurológicos e psiquiátricos devido a vulnerabilidade do sistema nervoso central ao estresse oxidativo (Takuma, Baba e Matsuda 2004). Estudos recentes têm mostrado alterações nas enzimas antioxidantes nos eritrócitos de pacientes com THB (Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003; Kuloglu et al., 2002). Além disso, em um estudo piloto encontrou-se um aumento dos níveis da proteína S100B durante episódios maníacos (Machado-Vieira et al., 2002).

Estudos familiares, estudos com gêmeos e estudos de adoção demonstram claramente que a hereditariedade genética é um dos fatores determinantes para o desenvolvimento do transtorno (Craddock e Jones, 1999). Quando comparamos o THB com a hereditariedade em relação a outras doenças, vemos que é maior do que a do câncer de mama e do diabetes tipo II, sendo que o risco de um familiar em primeiro grau de um indivíduo afetado desenvolver a doença é 10 vezes maior que o risco da população em geral (Craddock, O'Donovan MC e Owen, 2005).

Estudos neuroanatômicos, baseados nas imagens obtidas por ressonância magnética, demonstram alterações do volume de determinadas regiões cerebrais envolvidas na regulação do humor. Achados que têm sido replicados no THB incluem:

- a) diminuição do volume do córtex pré-frontal (CPF) subgenual (Drevets, Manji e Duman, 2001). O córtex pré-frontal de pacientes bipolares contém menos neurônios não-piramidais, particularmente aqueles com fenótipo GABAérgico (Knable 1999; Beasley et al, 2002).
- b) aumento do volume da amígdala e do estriado (Hajek, Carrey e Alda, 2005; Strakowski, DelBello e Adler, 2005).

Já os estudos neurofuncionais, baseados em ressonância magnética funcional e tomografia por emissão de pósitrons (PET), apontam para uma diminuição significativa do metabolismo do CPF durante a depressão e subsequente aumento em algumas regiões do CPF durante a fase maníaca (Malhi et al., 2004; Strakowski, DelBello e Adler, 2005). Além disso, a diminuição do metabolismo do CPF parece estar acompanhada de um aumento no metabolismo da amígdala e do estriado, sugerindo que alterações no circuito que compreende o CPF, sistema límbico e gânglios da base podem estar associadas à fisiopatologia do THB.

No que se refere ao HIPO, embora a maioria dos estudos não tenha encontrado alterações do seu volume no THB, três grupos independentes que utilizaram a técnica de espectroscopia por ressonância magnética observaram uma diminuição do N-acetil-aspartato (um marcador de viabilidade neuronal) no HIPO de indivíduos bipolares (Atmaca et al.,2006; Bertolino et al., 2003; Deicken et al., 2003), sugerindo uma diminuição do funcionamento dos neurônios hipocampais no THB.

No HIPO também, indivíduos com THB apresentam diminuição da arborização de dendritos apicais, bem como diminuição da densidade de espinhas dendríticas em neurônios piramidais (Rosoklija et al., 2000), e diminuição do número de neurônios não-piramidais na região CA2 (Benes et al., 1998). Uma avaliação mais detalhada destas alterações neuropatológicas sugere que estas modificações seguem um padrão de alteração no desenvolvimento neuronal e de neuroplasticidade, e não um padrão de degeneração cerebral como previamente se pensava (Rajkowska, 2003).

Nesta mesma linha, estudos conduzidos em tecido *pos-mortem* revelaram que indivíduos bipolares apresentam uma diminuição significativa de células neuronais e gliais no CPF dorsolateral e no CPF subgenual (Rajkowska, Halarie e Selemon, 2001; Öngur, Drevets e Price, 1998; Bouras et al., 2001). Não se sabe, porém, o que estas deficiências indicam. Podem ser:

- a) resultado de alguma anomalia do desenvolvimento que poderia ocasionar uma maior suscetibilidade;
- b) mudanças compensatórias a outros processos patogênicos ou ainda;
- c) seqüelas de episódios recorrentes do THB. (Drevets, Manji e Duman, 2001)

Em paralelo, tem sido demonstrado que antidepressivos e estabilizadores de humor atuam modulando diversas cascatas de sinalização celular envolvidas em neuroplasticidade e sobrevivência neuronal (Manji, Drevets e Charney, 2001; Schaltiel, Chen e Manji, 2006). A primeira evidência surgiu dos trabalhos do laboratório do Prof. Ronald Duman, demonstrando que o uso crônico de

antidepressivos e de choques eletroconvulsivos aumentam a expressão do RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do seu receptor TrkB (receptor tirosina-quinase B) e do fator de transcrição nuclear CREB (*cAMP response element binding*) em HIPO de ratos (Nibuya, Morinobu e Duman 1995; Nibuya, Nestler e Duman. 1996). Mais recentemente, estudos pré-clínicos têm demonstrado que o tratamento crônico com Li ou VPT (medicamentos de primeira linha para o tratamento do THB) também são capazes de aumentar a expressão do BDNF no córtex frontal e HIPO (Einat et al., 2003; Fukumoto et al., 2001). Além disso, os estabilizadores do humor possuem outros mecanismos de ação em comum, como inibição da GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3-beta*), uma proteína que regula vias de sobrevivência e morte celular, e diminuição de inositol, um precursor da via de sinalização do fosfatidilinositol (Coyle e Manji 2002; Williams et al., 2002).

Os medicamentos bloqueadores do receptor dopaminérgico D2 são considerados agentes de primeira escolha no manejo da mania aguda (Yatham et al., 2005). Um estudo de PET demonstrou que o tratamento com diVPT de sódio reduziu a captação de <sup>18</sup>F-DOPA no estriado de pacientes bipolares em episódio maníaco, o que sugere uma diminuição da função dopaminérgica pré-sináptica após o uso de diVPT (Yatham et al., 2002). Alterações de receptores dopaminérgicos no THB têm sido demonstrados em dois estudos que observaram um aumento de 25% da expressão do RNAm do receptor D1 na região CA2 do HIPO (Pantazopoulos et al., 2004) e uma menor expressão do receptor D3 em



linfócitos de indivíduos bipolares (Vogel et al., 2004). Mais recentemente, tem sido sugerido que variações do gene do transportador de DA podem estar envolvidas na suscetibilidade para o desenvolvimento do THB (Greenwood et al., 2006). Em conjunto, estes estudos indicam que alterações do sistema dopaminérgico podem estar envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos do THB.

Este recente corpo de evidências dá um passo adiante em relação à antiga “hipótese monoaminérgica”, a qual sugeria que os transtornos de humor seriam causados por uma deficiência de monoaminas, particularmente de serotonina e norepinefrina (Schildkraut, 1965). Atualmente acredita-se que os transtornos de humor estão associados a alterações no sistema de comunicação entre os circuitos cerebrais reguladores do humor, e que antidepressivos e estabilizadores do humor ativam cascatas de sinalização que regulam a plasticidade e sobrevivência celular, com subsequente melhora gradativa da transmissão da informação nestes circuitos cerebrais (Castrén, 2005; Coyle e Duman, 2003; Nestler et al., 2002; Manji, Drevets e Charney, 2001).

### **3. Neurotrofinas**

Na década de 50 (1953), foi identificada a primeira neurotrofina. Trata-se do Fator de Crescimento do Nervo (Nerve Growth Factor – NGF). Tal descoberta abriu, sem dúvida, um horizonte extremamente vasto na neurobiologia para a identificação e elucidação das funções celulares.

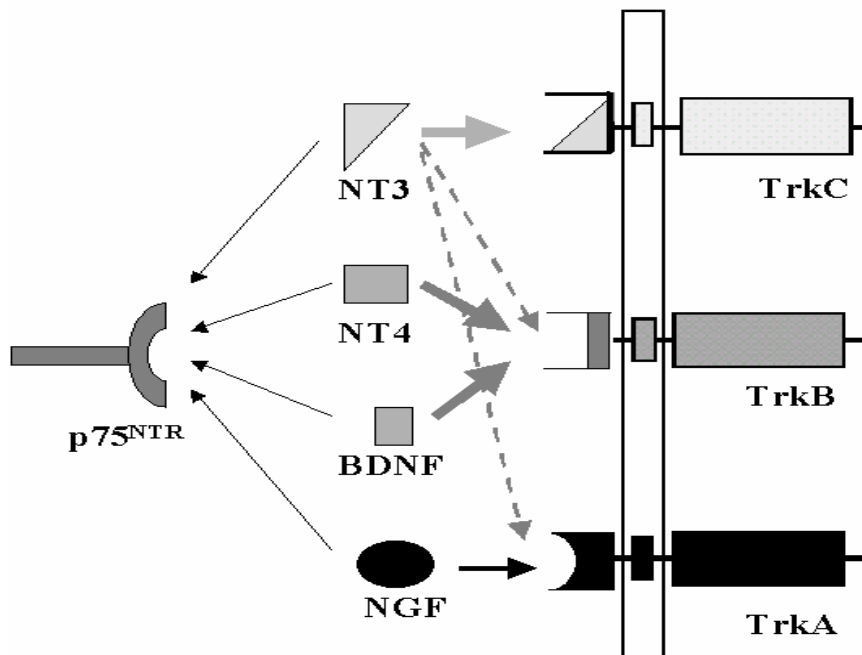
Quase trinta anos após a identificação do NGF, como o protótipo das neurotrofinas para neurônios do sistema nervoso autônomo, foi isolado (1982), em neurônios de porcos, um homólogo do NGF, que foi chamado de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF). A partir de então, quatro membros adicionais da família das neurotrofinas foram identificados: Neurotrofina-3 (Neurotrophin-3 – NT-3) em 1990, Neurotrofina-4/5 (Neurotrophin-4/5 – NT-4/5) em 1991, Neurotrofina-6 (Neurotrophin-6 – NT-6) em 1994 e Neurotrofina-7 (Neurotrophin-7 – NT-7) em 1998 (Lessmann, Gottmann e Malsangio, 2003).

A descoberta dos receptores das neurotrofinas ocorreu várias décadas após a identificação do NGF, a primeira neurotrofina a ser identificada, e, sem dúvida, foi um avanço gigantesco na neurobiologia, especialmente porque forneceu ferramentas para a busca das rotas controladas pelas neurotrofinas (Ras, Rap-1, Cdc-42-Rac-Rho, como também MAPK, ERK, PI-3-kinase e phospholipase-C-C- $\gamma$  {PLC- $\gamma$ }). Estas vias de sinalização intracelular moduladas pelas neurotrofinas estão envolvidas não apenas em mecanismos patológicos relacionados a eventos da doença, como também na modulação de plasticidade fisiológica. Como exemplo, cita-se a facilitação da memória em roedores e ativação de MAPK na região do CA1 pelo NGF (Walz et al., 2000).

A família dos receptores tirosina-quinases – Trk – é composta por três receptores que podem ser ativados por uma ou mais neurotrofinas: NGF, BDNF,

NT-3 e NT-4/5. A presença de TrkA, TrkB ou TrkC confere responsividade, respectivamente, ao NGF, BDNF ou NT-4/5 e NT-3. A presença ou ausência de cadeias curtas de aminoácidos na região de cada receptor tem demonstrado regular a especificidade da resposta ao receptor Trk.

O receptor pan-neurotrofina,  $p75^{NTR}$ , também regula a resposta aos receptores Trk. Na presença de  $p75^{NTR}$ , o NT-3 é muito menos efetivo em ativar a TrkA, e o NT-3 e o NT-4/5 são muito menos efetivos em ativar a TrkB. Em outras palavras, a presença de  $p75^{NTR}$  aumenta a especificidade do TrkA e do TrkB aos seus ligantes primários, NGF e BDNF, respectivamente (Huang, Reichardt, 2003). A figura a seguir apresenta as neurotrofinas e seus receptores.



**Figura 1.** Neurotrofinas e seus receptores.

O  $p^{75ntr}$  é um pan-receptor das neurotrofinas. NT4 e BDNF têm uma afinidade especial para TrkB, NGF para TrkA e NT3 para TrkC; contudo estudos mostram que esta neurotrofina pode ser ativada por TrkB e A em algumas situações. Legenda NT3: neurotrofina-3; NT-4: neurotrofina 4; BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor; NGF: Nerve Growth Factor; TrkC, B ou A- tirosina-quinase C, B ou A e  $p^{75ntr}$  – receptor neurotrófico  $p^{75}$  (Adaptada de Schramm et al., 2005).

Estudos sobre as relações entre as neurotrofinas, seus receptores e os seus efeitos ainda estão em andamento e muito precisa ser compreendido, justamente devido a grande complexidade destas relações, além das cascatas específicas que ativam. Ou seja, as diferentes ativações dos TrkKs têm diferentes conseqüências nas diferentes pilhas neuronais. (Lewis et al., 2006; Huang e Reichardt, 2003). Em oncologia, por exemplo, já se sabe que quando o TrkC e/ou TrkA está significativamente expresso, o neuroblastoma é de melhor prognóstico, correlacionando-se com a sobrevivência do paciente. Já quando o TrkB, ativado pelo BDNF, está fortemente expresso, encontramos-nos diante de um quadro altamente desfavorável para a sobrevivência do paciente (Schramm et al., 2005).

Nos estudos sobre modelos de depressão, os antidepressivos aumentam a sinalização do TrkB, sendo esta dependente da concentração de BDNF. (Saarelainen et al., 2003). Além disto, uma das vias que sabidamente previnem contra a apoptose é a cascata de sinalização promovida pela ligação do BDNF ao seu receptor TrkB (BDNF/TrkB) (Barde, 1994). Diversos estudos têm sugerido que a indução do BDNF/TrkB é um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos terapêuticos dos estabilizadores do humor e dos antidepressivos (Coyle e Duman 2003; Nibuya, Morinobu e Duman, 1995). Por exemplo, tem sido demonstrado que o uso do Li modula a fosforilação (atividade) do receptor TrkB e do CREB (Einat et al., 2003; Rantamäki et al., 2006).

Nestas breves observações, podemos ver que as neurotrofinas promovem um jogo excepcionalmente variado de respostas que requerem, por sua vez, um mecanismo altamente regulado de transdução de sinal (Schramm et al., 2005), aonde o antagonismo pode jogar um papel importante na biologia das neurotrofinas (Brodski, Schürch e Dechan, 2000).

O que se sabe, e parece ser consenso entre os autores, é que o aumento das neurotrofinas tem a função prioritária de proteger os neurônios da excitotoxicidade (Lessmann, Gottmann e Malcangio, 2003). Mesma função protetora descrita para os estabilizadores de humor Li e VPT (Shao, Young e Wang, 2005). Ou seja, as neurotrofinas têm sido descritas como promotoras da plasticidade neuronal, desempenhando papéis na neuroproteção e reorganização, funcionando como um mecanismo de compensação endógeno para promover regeneração e reparação

no Sistema Nervoso Central (Felderhoff-Mueser U et al., 2002). Existem várias evidências indicando que as neurotrofinas modulam a transmissão sináptica por mecanismos pré-sinápticos ou pós-sinápticos (Schuman, 1999).

Além deste efeito de regeneração, Kalb (2005) descreve que as neurotrofinas podem ser responsáveis pela sobrevivência ou morte neuronal. Este efeito paradoxal estaria associado a dois fatores, não necessariamente dependentes:

- a) um relacionado à concentração das neurotrofinas;
- b) outro, ao modo de ativação dos receptores.

Embora a maior parte dos autores descrevam que o  $p75^{NTR}$  e Trk estão ligados à sobrevivência celular, há relatos na literatura que os receptores Trk possam, em algumas situações, causar a morte neuronal (Kalb, 2005), como vimos acima em relação ao BDNF/TrkB em oncologia.

Em relação ao BDNF, existem muitas evidências quanto ao seu papel a longo prazo na plasticidade sináptica no HIPO e no néo-córtex (Lessmann, Gottmann e Malcangio, 2003).

Estudos em genética e em farmacologia têm sugerido que o BDNF e o GDNF possam estar associados à fisiopatologia do THB (Cunha et al., 2006; Rosa et al., 2006, Takebayashi et al., 2006). Níveis séricos de BDNF encontraram-se diminuídos durante episódios maníacos e depressivos. Em pacientes eutímicos os níveis estão similares aos dos controles (Cunha et al., 2006). De outra forma, os

níveis séricos de GDNF encontraram-se aumentados nos episódios maníacos e depressivos e semelhantes aos controles em pacientes eutímicos (Rosa et al., 2006).

Apesar de inúmeras considerações sobre os papéis das neurotrofinas em transtorno de humor e, em especial, no THB, não existem estudos experimentais que mostrem possíveis alterações do NGF, NT-3 e NT-4/5 no THB. Para tanto, nos debruçaremos aqui no estudo do NT-3 e suas possíveis alterações no THB.

### **3.1 A neurotrofina-3**

O NT-3, um membro da família dos fatores de crescimento nervosos, apresenta níveis muito mais elevados de expressão durante o desenvolvimento pré-natal, especialmente no HIPO, neo-córtex e cerebelo. Logo após o nascimento, as outras neurotrofinas, especialmente o BDNF, aumentam seus níveis de expressão, chegando aos níveis do NT-3 (Lessmann, Gottmann e Malcangio, 2003). O NT-3 também induz a diferenciação neuronal dos precursores das células corticais (Ghosh e Greenberg, 1995) e aumenta a neurogênese do trato córtico-espinal (Schnell et al., 1994). Os neurônios hipotalâmicos expressam o TrKC, o receptor primário do NT-3 (Urfer et al., 1994), sugerindo que o NT-3 possa influenciar os neurônios hipotalâmicos.

O NT-3 também é a primeira neurotrofina a ser expressa no Sistema Nervoso Periférico, promovendo a sobrevivência e a diferenciação de neurônios da medula, células de Purkinje e de neurônios sensoriais, muitos destes tornando-se dependentes do NGF nos primeiros estágios pós-natais (Lessmann, Gottmann e Malsangio, 2003; Lindholm et al 1993; Ávila et al 1993).

Estudos imunobioquímicos em macacos demonstraram que o NT-3 tem uma distribuição similar às demais neurotrofinas na substância cinzenta, sendo pouco distribuído no cerebelo, hipotálamo e tálamo. Por outro lado, nos gânglios basais o NT-3 encontra-se distribuído, porém em concentrações inferiores ao BDNF e NGF. Na glia há uma expressão fraca de BDNF, NGF, NT-3 e NT-4. No HIPO, foram encontradas concentrações significativas de NT-3 nas regiões CA2 e CA3 e no giro dentado (Zhang et al., 2006).

Estudos *in vitro* em tecidos fetais demonstraram que o NT-3 aumenta a sobrevivência dos neurônios noradrenérgicos (Friedman et al., 1993; Reiriz et al., 2002). Shimazu e colaboradores (2006) demonstraram que o NT-3 é amplamente distribuído no giro dentado hipocampal de ratos adultos, uma área que exhibe neurogênese significativa, e pode estar envolvida na memória espacial (Shimazu et al., 2006).

Gao e Pol (1999) sugeriram que o NT-3 aumenta a liberação de GABA durante o período de desenvolvimento, quando o GABA é um potente despolarizador, mas não quando o GABA age como inibidor, sugerindo que o mecanismo pelo qual o



NT-3 pode influenciar o desenvolvimento neuronal ocorre via potenciação pré-sináptica do GABA. Além dos achados a cerca do seu importante papel nos primórdios do desenvolvimento neuronal, o NT-3 também pode influenciar sinapses de neurônios maduros, em especial de neurônios gabaérgicos.

É importante lembrarmos que a transmissão sináptica GABAérgica é anterior à transmissão glutamatérgica no desenvolvimento do SNC (Reynolds & Brien, 1992; Chen, Trombley e van den Pol, 1995 e 1996; Ben-Ari et al. 1997). Devido ao relativo potencial positivo de Cl<sup>-</sup>, o GABA é excitatório, agindo como um despolarizante de potencial de membrana, potencial de ação evocado e liberação de cálcio citosólico (Obrietan & van den Pol, 1995; Chen, Trombley e van den Pol, 1996; Gao, Chen e van den Pol, 1998). A transmissão sináptica excitatória mediada por receptores gabaérgicos pode compreender a maior força excitatória no desenvolvimento do hipotálamo e outras regiões do SNC (Ben-Ari et al. 1989; LoTurco et al. 1995; Obrietan & van den Pol, 1995; Chen, Trombley e van den Pol, 1996; Owens et al. 1996; Leinekugel et al. 1997; Gao, Chen e van den Pol 1998).

Gao e Pol (1999) aplicaram intracelularmente K252a, um inibidor não seletivo da tirosina quinase, e este não foi capaz de bloquear o efeito de NT-3. Em contraste, a aplicação de K252a aumentou o sinal espontâneo pós-sináptico (sPSC - spontaneous postsynaptic currents), através do NT-3, o que é consistente, pois o NT-3 produz indução pré-sináptica da tirosina quinase. A diminuição de cálcio extracelular, através de BAPTA (um quelante do cálcio) ou por inibidor de

canal de cálcio  $\text{Cd}^{+2}$  aumentam a frequência de sPSC mediante a presença do NT-3, sugerindo que a entrada de cálcio na célula é facilitada por NT-3.

#### **4. Estabilizadores de Humor**

O tratamento farmacológico do THB visa prevenir novos episódios de mania e depressão. Os estabilizadores de humor, especialmente o Li e o VPT são considerados a primeira linha de prevenção e manutenção do THB (Yatham et al., 2005). Estudos mostram que os efeitos neuroprotetores do Li e VPT podem ser os responsáveis pelos seus efeitos terapêuticos e um dos mecanismos implicados seria o da liberação de neurotrofinas (Rosa et al., 2006; Cunha et al., 2006; Laeng et al., 2004)

O tratamento crônico com Li ou VPT, em doses terapêuticas, produz efeitos protetores contra excitotoxicidade e morte celular induzidas pelo Glutamato (Shao 2005). Em relação ao BDNF, existem muitas evidências quanto ao seu papel a longo prazo na plasticidade sináptica no HIPO e no néo-córtex. A aplicação de BDNF exógeno realça a eficácia pré-sináptica aumentando a liberação do glutamato em sinapses excitatórias (Lessmann, Gottmann e Malsangio, 2003).

Especificamente sobre Li, sabe-se que ele proporciona uma regulação positiva na sobrevivência celular além de prevenir a apoptose e o retardo da neurogênese após danos agudos no cérebro (ex: doenças neurodegenerativas e danos químicos) (Wada A 2005).

Estudos de cultura neuronal de ratos demonstraram que o VPT apresenta efeito neurogênico superior ao BDNF ou NT-3, além de exceder levemente os efeitos neurogênicos obtidos pelo Li, não sendo observados estes efeitos com a aplicação de carbamazepina, outro estabilizador de humor.

Como visto anteriormente, a literatura sugere que o NT-3 estimula a ação gabaérgica. Um mecanismo de ação clássico proposto para o VPT é via redução da degradação do GABA. Experimentos recentes têm mostrado que um outro mecanismo possa também ser responsável pela ação do VPT: a produção de neurônios gabaérgicos pelas células primitivas cerebrais. O mesmo foi observado com administração de Li e NT-3 (Laeng et al., 2004; Knable et al., 2001).

O VPT também estimula a proliferação de neurônios progenitores derivados de células corticais primárias, aumenta o número de neurônios e diminui o número de astrócitos gerados através destas, porém sem afetar seu número. Estes achados sugerem que o VPT possa estimular a proliferação de neurônios progenitores derivados de células primárias através da *up-regulation* da ciclina D2. Isto previne o êxito do ciclo celular comandado pelo NT-3, que irá promover a sobrevivência e a diferenciação de neurônios no sistema nervoso (Laeng et al, 2004).

## **Objetivos**

### **Geral**

- Estudar alterações do NT-3 no Transtorno de Humor Bipolar.

### **Específicos**

- Caracterizar os níveis de NT-3 no soro de pacientes com Transtorno de Humor Bipolar, nas fases de mania, depressão e eutimia comparados com controles.
- Comparar a ação do Li e VPT sobre o NT-3 no sangue e HIPO de ratos, tanto no modelo da prevenção como da reversão da mania.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, Gonçalves CA, Kapczinski F. 2006. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Research*, In press.
- Atmaca M, Yildirim H, Ozdemir H, Poyraz AK, Tezcan E, Ogur E. 2006. Hippocampal (1)H MRS in first-episode bipolar I patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 30(7):1235-1239.
- Avila MA, Varela-Nieto I, Romero G, Mato JM, Giraldez F, Van de Water TR, Represa J. 1993. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 support the survival and neuritogenesis response of developing cochleovestibular ganglion neurons. *Developmental Biology* 159:266-275.
- Barde YA. 1994. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Progress in Clinical and Biological Research* 390:45-56.
- Beasley C. L., Zhang Z. J., Patten I. and Reynolds G. P. 2002 Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biological Psychiatry* 52:708-715.
- Belmaker RH. 2004. Medical progress: bipolar disorder. *New England Journal of Medicine* 351:476-486.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. & Gaiarsa, J. L. 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. *Journal of Physiology* 416:303-325.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O. & Gaiarsa, J. L. 1997. GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends in Neurosciences* 20:523-529.
- Benes F. M., Kwok E. W., Vincent S. L. and Todtenkopf M. S. 1998 A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biological Psychiatry* 44:88-97.
- Benes F.M. and Berretta S. 2001. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25, 1-27.
- Benes FM, Kwok EW, Vincent SL, Todtenkopf MS. 1998. A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic-depressives. *Biological Psychiatry* 44:88-97.

- Bertolino A, Frye M, Callicott JH, Mattay VS, Rakow R, Shelton-Repella J, Post R, Weinberger DR. 2003. Neuronal pathology in the hippocampal area of patients with bipolar disorder: a study with proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Biological Psychiatry* 53:906-913.
- Bouras C, Kovari E, Hof PR, Riederer BM, Giannakopoulos P. 2001. Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathologica* 102:373-379.
- Brodski C, Schürch H, Dechan G. 2000. Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97:9683-9688.
- Castrén E. 2005. Is mood chemistry? *Nature Reviews Neuroscience* 6:241-246.
- Chen, G., Trombley, P. Q. & van den Pol, A. N. 1995. GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development; differential regulation by astrocytes. *Journal of Neurophysiology* 74:1473-1484.
- Chen, G., Trombley, P. Q. & van den Pol, A. N. 1996. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *Journal of Physiology* 494:451-464.
- Coyle JT, Manji HK. 2002. Getting balance: drugs for bipolar disorder share target. *Nature Medicine* 8:557-558.
- Coyle JT, Duman RS. 2003. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 38:157-160.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. 2005. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *Journal of Medical Genetics* 42:193-204.
- Craddock N, Jones I. 1999. Genetics of bipolar disorder. *Journal of Medical Genetics* 36:585-594.
- Cunha ABM, Frey BN, Andreatza AC, Góí JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. 2006. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neuroscience Letters* 398:215-219.

- Deicken RF, Pegues MP, Anzalone S, Feiwell R, Soher B. 2003. Lower concentration of hippocampal N-acetylaspartate in familial bipolar I disorder. *American Journal of Psychiatry* 160:873-882.
- Dennehy EB, Suppes T, Rush AJ, Miller AL, Trivedi MH, Crismon ML, Carmody TJ, Kashner TM. 2005. Does provider adherence to a treatment guideline change clinical outcomes for patients with bipolar disorder? Results from the Texas Medication Algorithm Project. *Psychological Medicine* 35:1695-1706.
- Drevets WC, Manji HK, Duman, RS. 2001. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: Implications for the development of novel therapeutics.. *Psychopharmacology Bulletin* 35:5-49.
- Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Manji HK, Chen G. 2003. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood regulation. *Journal of Neuroscience* 23:7311-7316.
- Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P, Ikonomidou C. 2002. Pathways Leading to Apoptotic Neurodegeneration Following Trauma to the Developing Rat Brain. *Neurobiology of Disease* 11:231-245.
- Friedman E, Hoau-Yan-Wang, Levinson D, Connell TA, Singh H. 1993. Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biological Psychiatry* 33(7):520-5.
- Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. 2001. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 158:100-106.
- Gao, X.-B., Chen, G. & van den Pol, A. N. 1998. GABA-dependent firing of glutamate-evoked action potentials at AMPA/kainate receptors in developing hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* 79:716-726.
- Gao XB, van den Pol. 1999. Neurotrophin-3 potentiates excitatory GABAergic synaptic transmission in cultured developing hypothalamic neurons of the rat. *Journal of Physiology* 518:81-95.
- Ghosh A, Greenberg ME. 1995. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:89-103.
- Grant BF, Stinson FS, Hasin DS, Dawson DA, Chou SP, Ruan WJ, Huang B. 2005. Prevalence, correlates, and comorbidity of bipolar I disorder and axis I

- and II disorders: results from the National Epidemiologic Survey on alcohol and related conditions. *Journal of Clinical Psychiatry* 66:1205-1215.
- Greenwood TA, Schork NJ, Eskin E, Kelsoe JR. 2006. Identification of additional variants within the human dopamine transporter gene provides further evidence for an association with bipolar disorder in two independent samples. *Molecular Psychiatry* 11:125-133.
- Hajek T, Carrey N, Alda M. 2005. Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder. *Bipolar Disorders* 7:393-403.
- Heckers S., Stone D., Walsh J., Shick J., Koul P. and Benes F. M. 2002. Differential hippocampal expression of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 messenger RNA in bipolar disorder and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 59:521–529.
- Huang EJ and Reichardt LF. 2003. TRK receptors : Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry* 72:609-642.
- Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, Yolken RH. 2000. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Molecular Psychiatry* 5:142-149.
- Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon DA, Leon AC, Rice JA, Keller MB. 2002. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Archives of General Psychiatry* 59:530-537.
- Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Leon AC, Solomon DA, Coryell W, Maser J, Keller MB. 2005. Psychosocial disability in the course of bipolar I and II disorders. *Archives of General Psychiatry* 62:1322-1330.
- Kalb, R. 2005 The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends in Neuroscience* 28:5-11.
- Knable M. B. 1999. Schizophrenia and bipolar disorder: findings from studies of the Stanley Foundation Brain Collection. *Schizophrenie Research*.39:149–152; discussion 163.
- Knable MB, Torrey EF, Webster MJ, Bartko JJ. 2001. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Research Bulletin* 55:651-659.



- Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochemistry and Function* 20:171-175.
- Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, Drabik CE, Weiner A, Tang H, Thyagarajan R, Mallon BS, Altar CA. 2004. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. *Journal of Neurochemistry* 91:238-251.
- Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. 1997. Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA-A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18,:243-255.
- Lenox RH, Gould TD, Manji HK. 2002. Endophenotypes in bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics* 114:391-406.
- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology* 69:341-374.
- Lewis MA, Huniha L, Franco D, Robertson B, Palmer J, Laurent DR, Balasubramania BN, Li Y, Westphal R. 2006. Identification and Characterization of Compounds That Potentiate NT-3-Mediated TrK Receptor Activity. *Molecular Pharmacology* 69:1396-1404.
- Lindholm D, Castren E, Tsoulfas P, Kolbeck R, Berzaghi Mda P, Leingartner A, Heisenberg CP, Tessarollo L, Parada LF, Thoenen H. 1993. Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *The Journal of cellof biology* 122:443-450.
- Lopez AD, Murray CJL. 1998. The global burden of disease, 1990-2020. *Nature Medicine* 4:1241-1243.
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J. S., Davis, M. B. E. & Kriegstein, A. R. 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.
- Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Gonçalves CA, Soares JC, Kapczinski F, Souza DO. 2002. Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *European Neuropsychopharmacology* 12(3):269-272.

- Malhi GS, Lagopoulos J, Owen AM, Yatham LN. 2004. Bipolaroids: functional imaging in bipolar disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 110(Suppl. 422):46-54.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nature Medicine* 7:541-547.
- Müller-Oerlinghausen B, Berhofer A, Bauer M. 2002. Bipolar disorder. *Lancet* 359:241-247.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *Journal of Neuroscience* 15:7539-7547.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. 1996. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 16:2365-2372.
- Obrietan, K. & van den Pol, A. N. 1995. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca<sup>2+</sup> elevating to depressing. *Journal of Neuroscience* 15:5065-5077.
- Öngür D, Drevets WC, Price JL. 1998. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 27:13290-13295.
- Owens, D. F., Boyce, L. H., Davis, M. B. E. & Kriegstein, A. R. 1996. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *Journal of Neuroscience* 16:6414-6423.
- Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. 2004. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *International Clinical Psychopharmacology* 19:89-95.
- Pantazopoulos H, Stone D, Walsh J, Benes FM. 2004. Differences in the cellular distribution of D1 receptor mRNA in the hippocampus of bipolars and schizophrenics. *Synapse* 54:147-155.
- Perlis RH, Ostacher MJ, Patel JK, Marangell LB, Zhang H, Wisniewski SR, Ketter TA, Miklowitz DJ, Otto MW, Gyulai L, Reilly-Harrington NA, Sachs GS, Thase ME. 2006. Predictors of recurrence in bipolar disorder: primary outcomes from the systematic treatment enhancement program for bipolar disorder (STEP-BD). *American Journal of Psychiatry* 163:217-224.

- Post RM, Denikoff KD, Leverich GS, Altshuler LL, Frye MA, Suppes TM, Rush AJ, Keck PE Jr, McElroy SL, Luckenbaugh DA, Pollio C, Kupka R, Nolen WA. 2003. Morbidity in 258 bipolar outpatients followed for 1 year with daily prospective ratings on the NIMH life chart method. *Journal of Clinical Psychiatry* 64:680-690.
- Post RM, Ballenger JC, Uhde TW, Smith C, Rubinow DR, Bunney WE Jr. 1982. Effect of carbamazepine on cyclic nucleotides in CSF of patients with affective illness. *Biological Psychiatry* 9:1037-1045.
- Rajkowska G. 2003. Depression: what we can learn from postmortem studies? *Neuroscientist* 9:273-84.
- Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD. 2001. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 49:741-752.
- Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, Wagh UV, Debsikdar VB, Mahadik SP. 2003. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research* 121:109-22.
- Rantamäki T, Knuuttila JEA, Hokkanen ME, Castrén E. 2006. The effects of acute and long-term lithium treatments on TrkB neurotrophin receptor activation in the mouse hippocampus and anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology* 50:421-427.
- Reiriz J, Holm PC, Alberch J, Arenas E. 2002. BMP-2 and cAMP elevation confer locus coeruleus neurons responsiveness to multiple neurotrophic factors. *Journal of Neurobiology* 50:291-3047
- Reynolds, J. D. & Brien, J. F. 1992. Ontogeny of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid in the hippocampus of the guinea pig. *Journal of Developmental Physiology* 18:243:252.
- Rosa AR, Frey BN, Andrezza AC, Cereser KM, Cunha AB0, Quevedo J, Santin A, Gottfried C, Gonçalves CA, Vieta E, Kapczinski F. 2006. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunoccontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 23:146-150.
- Rosoklija G, Toomayan G, Ellis SP, Keilp A, Mann JJ, Latov N, Hays AP, Dwork AJ. 2000. Structural abnormalities of subiculum dendrites in subjects with

- schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Archives of General Psychiatry* 57:349-356.
- Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castren E. 2003. Activation of the TrkB Neurotrophin Receptor Is Induced by Antidepressant Drugs and Is Required for Antidepressant-Induced Behavioral Effects. *The Journal of Neuroscience* 23:349–357.
- Shao L, Young LT, Wang JF. 2005. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biological Psychiatry* 58:879-884.
- Schildkraut JJ. 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry* 122:509-522.
- Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. 1994. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367:171-173.
- Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, Limpt V van, Sieverts H, Kuhfittig-Kulle S, Pfeiffer P, Versteeg R, Eggert A. 2005. Biological Effects of TrKA and TrKB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Letters* 228:143-153.
- Schuman EM. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. 1999. *Current Opinion in Neurobiology* 9:105-109.
- Shaltiel G, Chen G, Manji HK. 2006. Neurotrophic Signaling Cascades in the Pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Current Opinion in Pharmacology* in press.
- Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, Lu B. 2006 NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learning and Memory*. 3(3):307-315.
- Strakowski SM, DelBello MP, Adler CM. 2005. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Molecular Psychiatry* 10:105-116.
- Takebayashi M, Hisaoka K, Nishida A, Tsuchioka M, Miyoshi I, Kozuru T, Hikasa S, Okamoto Y, Shinno H, Morinobu S. 2006. Decreased levels of whole blood glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in remitted patients with mood disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 9:607-612.

- Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte Apoptosis: implications for neuroprotection. 2004. *Progress In Neurobiology* 72(2):111-127.
- Urfer R, Tsoulfas P, Soppet D, Escandon E, Parada LF, Presta LG. 1994. The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin. *Embo Journal* 13:5896-5909.
- Vogel M, Pfeifer S, Schaub RT, Grabe HJ, Barnow S, Freyberger HJ, Cascorbi I. 2004. Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology* 50:305-310.
- Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H. 2005. Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacological Sciences* 99:307-321.
- Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MMR, Marins V, Brentani R, Rodnight R, Izquierdo I. 2000. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *European Journal of Neuroscience* 12:2185-2189.
- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lellouch J, Lepine JP, Newman SC, Rubio-Stipec M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen H, Yeh EK. 1996. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *Journal of American Medical Association* 276:293-299.
- Williams RS, Cheng L, Mudge AW, Harwood AJ. 2002. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature* 417:292-295.
- Yatham LN, Liddle PF, Shiah IS, Lam RW, Ngan E, Scarrow G, Imperial M, Stoessl J, Sossi V, Ruth TJ. 2002. PET study of [<sup>18</sup>F]6-fluoro-L-dopa uptake in neuroleptic- and mood-stabilizer-naive first-episode nonpsychotic mania: effects of treatment with divalproex sodium. *American Journal of Psychiatry* 159:768-774.
- Yatham LN, Kennedy SH, O'Donovan C, Parikh S, MacQueen G, McIntyre R, Sharma V, Silverstone P, Alda M, Baruch P, Beaulieu S, Daigneault A, Milev R, Young LT, Ravindran A, Schaffer A, Connolly M, Gorman CP. 2005. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies. *Bipolar Disorders* 7(Suppl. 3):5-69.

Zarate CA Jr, Singh J, Manji HK. 2006. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 59:1006-1120.

Zhang HT, Li LY, Zou XL, Song XB, Hu YL, Feng ZT, Wang TTH. 2006. The immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, NT-4 in the brains of adult Rhesus monkeys. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 9:1-66.

**Serum neurotrophin-3 is increased during manic and depressive  
episodes in bipolar disorder**

**(Submetido ao *Neuroscience Letters*)**

Julio C. Walz <sup>a</sup>, Ana C. Andreazza <sup>a,b</sup>, Benício N. Frey <sup>a,b</sup>, Alice A. Cacilhas <sup>a</sup>  
, Keila M. Ceresér <sup>a</sup>, Angelo B. M. Cunha <sup>c</sup>, Fernanda Weyne<sup>a</sup>, Laura Stertz<sup>a</sup> Aida  
Santin <sup>a</sup>, Carlos A. Gonçalves <sup>b</sup>, Flávio Kapczinski <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Zip: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo,  
Zip: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Department of Neuropsychiatry, Centro de Ciências da Saúde, Universidade  
Federal de Santa Maria. Faixa de Camobi Km 9, Zip: 97105-900, Santa Maria, RS,  
Brazil

\* Corresponding author: Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Zip code:  
90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: + 55 51 32227309. Fax: + 55 51  
21018846. E-mail: [kapcz@terra.com.br](mailto:kapcz@terra.com.br) (F. Kapczinski).

## ***Abstract***

Accumulating evidence suggest that neural changes and cognitive impairment may accompany the course of bipolar disorder. Such detrimental effects of cumulative mood episodes may be related to changes in neurotrophins that take place during mood episodes but not during euthymic phases. The present study investigated serum neurotrophin-3 (NT-3) levels in patients with bipolar disorder during manic, depressed, and euthymic states, using an enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich-ELISA). Serum NT-3 levels were increased in manic ( $p < 0.001$ ) and depressed ( $p < 0.001$ ) BD patients, as compared with euthymic patients and normal controls. These findings suggest that the NT-3 signaling system may play a role in the pathophysiology of BD.

*Keywords:* bipolar disorder; depression; mania; neurotrophin-3; pathophysiology



Bipolar disorder (BD) is a complex illness where episodes of mania alternate with depression and asymptomatic phases (euthymia). BD takes place in about 1% of the world population and is associated with increased mortality and burden [2]. While the pathophysiology of BD remains unclear, postmortem studies showed abnormal density and size of neuronal and glial cells in distinct subregions of the prefrontal cortex in patients with BD [11, 13]. Such morphological changes suggest impairment in cellular plasticity and resilience rather than a neurodegenerative pattern [14]. In this context, there is increasing evidence suggesting that neurotrophic signaling systems, which regulate cellular plasticity and survival, may be altered in patients with major mood disorders [7]. For instance, infusions of BDNF and NT-3 into the dentate gyrus produce antidepressant effect in rodents [17], and the BDNF gene has been put forward as a susceptibility gene for BD [18]. Using peripheral blood, we [3, 9, 15] and others [20] have demonstrated that serum BDNF and GDNF are altered during major mood episodes in BD. As there are no available reports of serum NT-3 assessment in BD subjects, the aim of the present study was to evaluate serum NT-3 levels in BD patients during mania, depression and euthymia, as compared to age- and gender-matched controls.

The present study was approved by the local ethics committee (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil) and all subjects provided written informed consent before entering in the study. Thirty euthymic, nineteen depressed and thirty-one manic patients were consecutively recruited from the Bipolar Disorders Program - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil and from the Inpatient Psychiatric Unit - Hospital Universitário de Santa Maria, Brazil. Diagnose was carried out using the Structured Clinical interview for DSM-IV - Axis I (SCID-I) [4], and the manic and

depressive symptoms were assessed using the Young Mania Rating Scale (YMRS) [21] and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) [6], respectively. Patients were considered euthymic if they did not meet criteria for current manic or depressive episode according to SCID-I and scored <7 on both YMRS and HDRS scales. Manic and depressive patients fulfilled SCID-I criteria for current manic or depressive episode, respectively. The control group consisted of eighty healthy volunteers matched by age and gender, who manifested interest in participating in the study. Control subjects were not on any psychiatric or neurological medication, had no history of psychiatric or neurological diseases, and had no history of psychiatric or neurological conditions in their first and second-degree relatives.

Five milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture into a free-anticoagulant vacuum tube. Blood was immediately centrifuged at 3000 x g for 5 min, and serum was kept frozen at -80°C until assayed. NT-3 serum levels were assessed using sandwich-ELISA from commercial kits which were handled according to the manufacturer's instructions (Chemicon, USA). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24h with the samples diluted 1:2 in sample diluent and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of NT3. Then, plates were washed four times with sample diluents and monoclonal anti-NT-3 rabbit antibody diluted 1:1000 in sample diluent was incubated for 2 hours at room temperature. After washing, a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated diluted 1:1000 for 1h at room temperature was carried out. After addition of streptavidin-enzyme, substrate, and stop solution the amount of NT-3 was determined (absorbance was set at 450nm). The standard curve demonstrates a direct relationship between Optical Density (OD) and NT-3

concentration. Total protein was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard. Statistical Product and Service Solutions, version 12.0 (SPSS) was used to perform the statistical analysis. The Kolmogorov–Smirnov test was used to confirm that the results were normally distributed. Depressed, manic, and euthymic patients were compared to the control group using a one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test when applicable.

Demographic and clinical characteristics of BD patients and controls are displayed in Table 1. There was no difference in age or gender between groups. All BD patients were on medication, but the number of medications, number of hospitalizations, age at first episode, and length of illness did not differ between groups. Depressed patients presented a higher number of suicide attempts, and manic patients had worse Clinical Global Impression (CGI) and Global Assessment of Functioning (GAF). Manic and depressive patients had higher serum NT-3 levels ( $F_{3,169} = 14.097$ ;  $p < 0.001$ ; see figure 1) than euthymic patients and controls. These results remained unchanged when controlled for confounders such as number of medications, number of suicide attempts, length of illness, GAF and CGI.

We showed that serum NT-3 is increased in BD subjects during manic and depressive episodes. To our knowledge, this is the first study to assess serum NT-3 levels in BD patients. These findings suggest increased production and/or secretion of NT-3 during acute mood states in BD. Recent studies suggest that levels of neurotrophic factors oscillate in an orchestrated fashion during the course of acute mood episodes and euthymic phases. For instance, serum BDNF is reduced in bipolar depression and mania [3, 9], while serum GDNF is increased

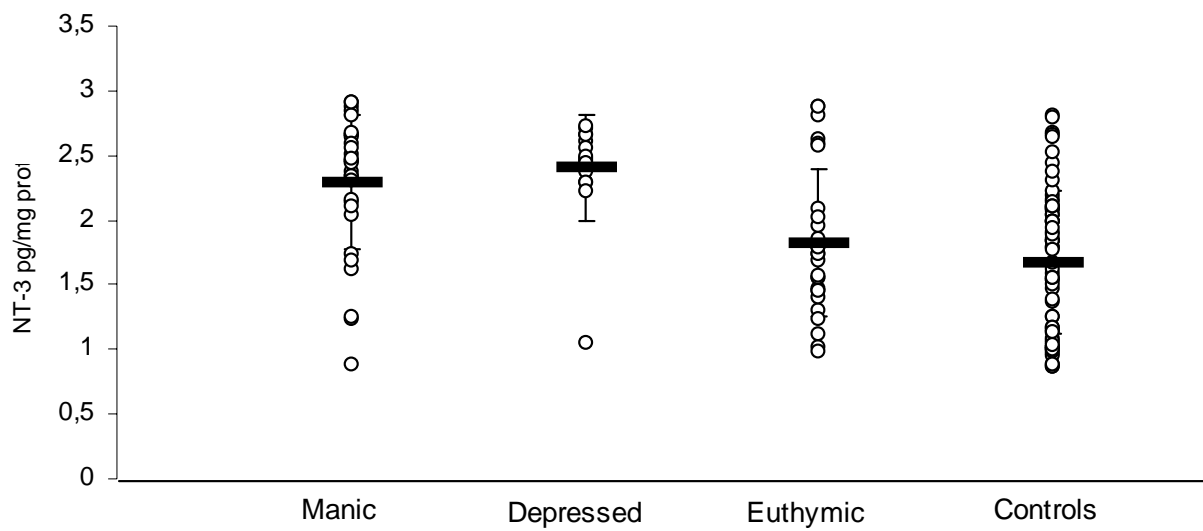
during mania and bipolar depression [15]. It is noteworthy that neurotrophic factors seem to be altered only during the course of acute mood states, while stabilized (euthymic) patients present neurotrophic factors in the same levels as controls [3, 15]. It has been reported that NT-3 is temporally and spatially expressed in the place of BDNF in some neuronal populations to compensate for the loss of BDNF [1]. These compensatory effects between NT-3 and BDNF were demonstrated by the fact that the critical role of these neurotrophins in the survival of hippocampal and cerebellar granule cells are revealed only when the signaling of both neurotrophins are blunted [10]. Further, NT-3 infusion increase BDNF mRNA expression in the cerebral cortex [16], and produces BDNF-like effects inducing cortical TrkB phosphorylation [15]. Therefore, we are tempted to speculate that this increment of serum NT-3 levels observed in the present study occurs in tandem with the lowering in BDNF serum levels described previously [3]. Such an increase in NT-3 could act as a compensatory physiological response to the strain imposed by mood episodes. This is in line with previous findings which showed that immobilization stress increased NT-3 mRNA expression in the dentate gyrus and locus coeruleus [19] and NT-3 infusion attenuated the correlates of disordered mood induced by the learned helplessness and forced swim test paradigms [17].

Some limitations of the present study should be addressed. Firstly, we measured NT-3 levels in serum. Nevertheless, it has been demonstrated that NT-3 cross the brain–blood barrier, and there is a strong positive correlation ( $r = 0.80$ ) between serum and brain NT-3 levels, suggesting that peripheral changes might correspond, at least in part, to central NT-3 changes [12]. Secondly, although it has been reported that antidepressants [19] but not antipsychotics [8] may affect NT-3

levels, little is known about the effects of other psychotropic agents on NT-3. Therefore, we cannot rule out the effects of medications in the present results. Further studies comparing NT-3 levels in medicated vs. unmedicated BD patients would help clarify this issue. In conclusion, we found that serum NT-3 levels are increased in BD patients during manic and depressive episodes, as compared with euthymic patients and healthy controls. The present findings suggest that NT-3 may be produced and/or secreted in response to the strain associated with acute mood episodes, and further support the current hypothesis that neurotrophins are involved in the pathophysiology of BD.

#### Acknowledgements

This study was supported in part by CAPES and CNPq (Brazil).



**Figure 1.** Increase NT-3 serum levels in manic and depressed bipolar patients in comparison with healthy controls. \*ANOVA and Tukey post test. Different letters representation significant differences,  $p < 0.01$ .

**Table 1.** Clinical and demographic characteristics of bipolar patients and healthy controls

|   | Healthy              | <i>Bipolar Patients</i> |                   |                       | <i>P</i> |
|---|----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
|   | Controls<br>(n = 80) | Euthymic<br>(n = 30)    | Manic<br>(n = 31) | Depressed<br>(n = 19) |          |
| Gender  |                      |                         |                   |                       |          |
| Female  | 56.3%                | 50.0%                   | 45.2%             | 48.0%                 | 0.555*   |
| Male  | 43.8%                | 50.0%                   | 54.8%             | 52.0%                 |          |
| Mean age<br>(Years, S.D.)                     | 41.73(10.63)         | 41.63(9.51)             | 39.53(12.70)      | 43.42(8.00)           | 0.638**  |
| Number of<br>medications (Mean,<br>S.D.)      | -                    | 2.93(1.23)              | 3.41(1.40)        | 2.66(0.96)            | 0.106**  |
| Number of<br>hospitalizations<br>(Mean, S.D.) | -                    | 4.69(5.42)              | 4.39(5.52)        | 7.26(7.57)            | 0.241**  |
| Number of suicide<br>attempts (Mean,<br>S.D.) | -                    | 1.95(1.70)              | 1.60(0.89)        | 3.86(3.03)            | 0.033**  |
| Age of first episode<br>(Mean, S.D.)          | -                    | 24.68(11.60)            | 25.61(10.92)      | 21.47(10.36)          | 0.428**  |
| Length of illness<br>(Years, S.D.)            | -                    | 16.25(10.39)            | 14.93(11.21)      | 22.74(10.71)          | 0.055**  |
| CGI (Mean, S.D.)                              | -                    | 3.53(1.65)              | 5.55(0,64)        | 4.05(1.03)            | 0.001**  |
| GAF (Mean, S.D.)                              | -                    | 60.76(13.45)            | 35.00(7.30)       | 55.94(9.76)           | 0.001**  |
| HAM-D (Mean, S.D.)                            | -                    | 5.65(3.37)              | 11.46(9.40)       | 16.89(7.51)           | 0.001**  |
| YMRS (Mean, S.D.)                             | -                    | 5.16(5.26)              | 34.19(8.24)       | 5.15(4.68)            | 0.001**  |

\* Chi-square test; \*\* One-way ANOVA test; CGI = Clinical Global Impression; GAF = Global Assessment of Functioning; HAM-D = Hamilton Depression Rating Scale; YMRS = Young Mania Rating Scale

## References

[1] K. Agerman, P. Ernfors. Differential influence of BDNF and NT3 on the expression of calcium binding proteins and neuropeptide Y in vivo, *Neuroreport*. 14(2003) 2183-2187.

[2] R.H. Belmaker. Bipolar disorder, *N Engl J Med*. 351 (2004) 476-486.

[3] A.B. Cunha, B.N. Frey, A.C. Andreazza, J.D. Godói, A.R. Rosa, C.A. Gonçalves, A. Santin, F. Kapczinski. Serum brain-derived neurotrophic is decreased in bipolar disorder during depressive and maniac episodes, *Neurosci Lett*. 398 (2006) 215-219.

[4] M.B. First, R.L. Spitzer, M. Gibbon, J.B. Williams. Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I), Biomedics Research Department, New York, 1998.

[5] K.M. Giehl, S. Röhrig, H. Bonatz, M. Gutjahr, B. Leiner, I. Bartke, Q. Yan, L.F. Reichardt, C. Backus, A. A. Welcher, K. Dethleffsen, P. Mestres, M. Meyer. Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 Antagonistically Regulate Survival of Axotomized Corticospinal Neurons *In Vivo*, *J Neurosci*. 21(2001) 3492–3502.

[6] M. Hamilton. A rating scale for depression, *J Neurol, Neurosurg Psychiatry*. 23 (1960) 56-62.

[7] K. Hashimoto, E. Shimizu, M. Iyo. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Research, Brain Res Rev*. 45 (2004) 104-114.

[8] A.M. Linden, J. Vaisanen, M. Lakso, H. Nawa, G. Wong, E. Castren. Expression of Neurotrophins in rat brain after administration of antipsychotic and psychotropic agents, *J Mol Neurosci*. 14(2000) 27-37.



[9] R. Machado-Vieira, M.O. Dietrich, R. Leke, V.H. Cereser, V. Zanatto, F. Kapczinski, D.O. Souza, L.V. Portela, V. Gentil. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode, *Biolog Psychiatry*. In press.

[10] L. Minichiello, R. Klein. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons, *Genes Dev.* 10 (1996) 2849-2858.

[11] D. Ongur, W.C. Drevets, J.L. Price. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders, *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 (1998) 13290-13295.

[12] W. Pan, W.A. Banks, A.J. Kastin. Permeability of the blood-brain barrier to neurotrophins, *Brain Res.* 788 (1998) 87-94.

[13] G. Rajkowska, A. Halaris, L.D. Selemon. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder, *Biolog Psychiatry.* 49 (2001) 741-752.

[14] G. Rajkowska. Depression: What we can learn from post mortem studies, *Neuroscientist.* 9 (2003) 273-284.

[15] A.R. Rosa, B.N. Frey, A.C. Andreazza, K.M. Cereser, A.B. Cunha, J. Quevedo, A. Santin, C. Gottfried, C.A. Gonçalves, E. Vieta, F. Kapczinski. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder, *Neurosci Lett.* 47(2006) 146-150.

[16] A. Schutte, Q. Yan, P. Mestres, K.M. Giehl. The endogenous survival promotion of axotomized rat corticospinal neurons by brain-derived neurotrophic

factor is mediated via paracrine, rather than autocrine mechanisms, *Neurosci Lett.* 290(2000) 185-188.

[17] Y. Shirayama, A.C. Chen, S. Nakagawa, D.S. Russel, R.S. Duman. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression, *J Neurosci.* 22 (2002) 3251-3261.

[18] P. Sklar, SB. Gabriel, MG. McClinnis, P. Bennett, YM. Lim, G.Tsan, S. Schaffner, G. Kirov, I. Jones, M. Owen, N. Craddock, J.R. DePaulo, E.S. Lander. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neurotrophic factor, *Mol Psychiatry.* 7(2002) 579-593.

[19] M.A. Smith, S. Makino, M. Altemus, D. Michelson, S.K. Hong, R. Kvetnansky, R.M. Post. Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus, *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (1995) 8788-8792.

[20] M. Takebayashi, K. Hisaoka, A. Nishida, M. Tsuchioka, I. Miyoshi, T. Koruzu, S. Hikasa, Y. Okamoto, H. Shinno, S. Morinobu, S. Yamawaki. Decreased levels of whole blood glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in remitted patients with mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 9 (2006) 607-612.

[21] RC Young, JT Biggs, VE Ziegler, DA Meyer. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry.* 133 (1978) 429-435.

## **NÍVEIS SÉRICOS ELEVADOS DE NEUROTROFINA-3 DURANTE EPISÓDIOS DE MANIA E DEPRESSÃO EM PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR**

### **Resumo**

Há muitas evidências de que alterações neuronais e prejuízo cognitivo possam acompanhar o curso do Transtorno Bipolar (TB). Os efeitos de alterações cumulativas podem estar relacionados a variações das neurotrofinas, que não ocorrem durante a fase eutímica. O presente estudo investiga os níveis séricos de neurotrofina-3 (NT-3) em pacientes portadores de transtorno de humor bipolar (THB) bipolares durante os estados maníaco, depressivo e eutímico usando uma técnica de enzima – imuno ensaio (ELISA sanduíche). Níveis séricos de NT-3 estavam aumentados em pacientes com TB em fase maníaca ( $p < 0.001$ ) e depressiva ( $p < 0.001$ ) quando comparados com pacientes eutímicos e controles normais. Estes achados sugerem que o sistema sinalizador do NT-3 pode ter um papel na fisiopatologia do THB.

Unitermos : transtorno bipolar ; depressão ; mania ; neurotrofina-3 ; fisiopatologia

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é uma doença complexa, caracterizada por episódios maníacos, depressivos e fases assintomáticas (eutímia). THB atinge cerca de 1% da população mundial, estando associado com aumento da mortalidade [2]. Embora sua fisiopatologia ainda não seja completamente entendida, estudos *postmortem* mostram densidade e tamanho anormais de células neuronais e gliais em sub-regiões distintas do córtex pré-frontal em pacientes com THB [11, 13]. Estas alterações morfológicas sugerem modificações na plasticidade e resiliência celular, mais do que um padrão neurodegenerativo [14]. Neste contexto há evidências sugerindo que sistemas sinalizadores neurotróficos, que regulam a sobrevivência e plasticidade neuronal e glial, possam estar alterados em pacientes com transtornos de humor maiores [7]. Em modelos experimentais, infusões das neurotrofinas Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) e NT-3 no giro dentado produzem efeitos antidepressivos em roedores [17], sendo o gene que codifica o do BDNF tem sido proposto como um gene candidato para suscetibilidade para THB [18]. Usando sangue periférico, pesquisadores de nosso grupo [3,9,15] e de outros [20] demonstraram que o BDNF e Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) séricos estão alterados durante episódios maiores do THB. Como nenhum estudo investigou o NT-3 sérico em pacientes com THB, o objetivo do presente estudo foi comparar os níveis séricos de NT-3 sérico de pacientes com THB durante a fase de mania, depressão e eutímia, com amostras de controles hígidos pareados por idade e sexo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (Hospital de Clínicas De Porto Alegre) e todos os participantes deram seu consentimento informado por escrito antes de entrarem no estudo. Trinta pacientes com THB eutímicos, dezenove em fase depressiva e trinta e um em fase maníaca foram recrutados consecutivamente no Programa de Transtorno do Humor do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil e na Unidade Psiquiátrica do Hospital Universitário de Santa Maria, Brasil. Os diagnósticos foram feitos através da Entrevista Clínica Estruturada do DSM-IV – Eixo I (SCID-I) (First et al, 1998), e os sintomas maníacos e depressivos foram avaliados pela Young Mania Rating Scale (YMRS)

(Young et al, 1978) e pela Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) (Hamilton, 1960), respectivamente. Os pacientes foram considerados eutímicos se não preenchessem os critérios para episódio maníaco ou depressivo atual, de acordo com o SCID-I e tivessem escore inferior 7 tanto na YMRS quanto na HDRS. Pacientes maníacos e deprimidos preenchem os critérios para episódio maníaco ou depressivo atual pelo SCID-I, respectivamente. O grupo controle consistiu de 80 voluntários saudáveis, pareados por sexo e idade, que manifestaram interesse em participar do estudo. Os controles não faziam uso de qualquer medicação psiquiátrica ou neurológica, não tinham história de patologias psiquiátricas ou neurológicas, nem história das mesmas em seus familiares de primeiro e segundo grau.

Foram coletados cinco mililitros de sangue por punção venosa de cada sujeito, e colocado em um tubo a vácuo sem anticoagulante. O sangue foi imediatamente centrifugado a 300 x g por 5 minutos, e o soro foi congelado a -80°C até ser analisado. Níveis séricos de NT-3 foram dosados por ELISA de captura, usando kits comerciais segundo instruções do fabricante (Chemicon, USA). Brevemente, placas contendo 96 poços foram revestidas durante 24h com a amostra diluída (1:2) em diluente específico para amostras e a curva padrão variou de 7.8 a 500 pg de NT-3. Então, os poços foram lavados 4 vezes com diluentes específicos e incubados com anticorpos monoclonais de rato anti-NT-3 diluídos 1:1000 por 1h e incubados a temperatura ambiente por 2h. Após a lavagem, foi feita uma segunda incubação anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase diluído 1:1000 por 1h em temperatura ambiente. Depois da adição de estreptavidina, substrato e solução de parada, a quantidade de NT-3 foi determinada (absorbância em 450 nm). A curva padrão demonstrou uma relação direta entre densidade óptica (OD) e concentração de NT-3. Proteínas totais foram dosadas pelo método de Lowry usando soro fetal bovino como padrão. O programa SPSS, *Statistical Product and Service Solutions*, versão 12.0 (SPSS), foi usado para realizar a análise estatística. O teste Kolmogorov–Smirnov foi utilizado para determinar a existência ou não de normalidade na distribuição dos

resultados. Pacientes com sintomas depressivos, maníacos e eutímicos foram comparados ao grupo controle usando uma ANOVA de uma via seguido pelo teste Tukey, quando indicado.

Características demográficas e clínicas dos pacientes com THB e controles estão listadas na tabela 1. Não houve diferença em idade ou sexo entre os dois grupos. Todos os pacientes com THB estavam medicados, sendo que o número de medicações e hospitalizações, idade do primeiro episódio e duração da doença não diferiu entre os grupos. Pacientes deprimidos apresentaram um número de tentativas de suicídio maior e pacientes maníacos apresentavam piores escores na Impressão Clínica Global (*Clinical Global Impression - CGI*) e na Avaliação do Funcionamento Global (*Global Assessment of Functioning - GAF*). Pacientes maníacos e deprimidos tiveram níveis de NT-3 sérico maior ( $F_{3,169} = 14.097$ ;  $p < 0.001$ ; ver figura 1) que pacientes em eutímia e controles. Estes resultados não se modificaram quando controlados para número de tentativas de suicídio, duração da doença, GAF e CGI.

Mostramos que níveis séricos de NT-3 estão aumentados nos pacientes com THB durante episódios maníacos e depressivos. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar NT-3 sérico em pacientes com THB. Estes achados sugerem aumento na produção e/ou secreção de NT-3 durante episódios agudos de humor no THB. Estudos recentes sugerem que os níveis de fatores neurotróficos oscilam de uma forma orquestrada durante o curso de episódios agudos e fases eutímicas. Por exemplo, o BDNF sérico está reduzido na depressão bipolar e mania [3,9], enquanto níveis de GDNF sérico estão aumentados durante a mania e depressão bipolar [15]. É digno de nota que fatores neurotróficos parecem estar alterados apenas durante o curso agudo de estados de humor, enquanto pacientes estabilizados (eutímicos) apresentam os níveis de fatores neurotróficos semelhantes aos controles [3, 15]. Foi referido que o NT-3 está temporal e espacialmente expresso no lugar do BDNF em algumas populações de neurônios, possivelmente para compensar a perda do BDNF [1].

Estes efeitos compensatórios entre NT-3 e BDNF foram demonstrados pelo fato de que o papel crítico destas neurotrofinas na sobrevivência das células granulares cerebelares e hipocampais são reveladas somente quando a sinalização de ambas as neurotrofinas está embotada [10]. Além disto, a infusão de NT-3 aumenta a expressão do mRNA do BDNF no córtex cerebral [16], e produz efeitos “tipo BDNF” induzindo a fosforilação do TrkB cortical [15]. Logo, estamos tentados a especular que o incremento nos níveis de NT-3 observados neste estudo ocorram em associação com a diminuição de níveis séricos de BDNF descritos previamente [3]. Este aumento poderia estar como uma resposta compensatória fisiológica às oscilações funcionais ocorridas nos episódios de humor. Isto está de acordo com achados prévios que mostram que no giro dentado e no *locus coeruleus* [19] uma infusão de NT-3 atenua os sintomas depressivos em modelos experimentais de depressão [17].

Algumas limitações do presente estudo devem ser consideradas. Primeiramente, medimos níveis séricos de NT-3. De qualquer forma, tem sido demonstrado que o NT-3 atravessa a barreira encefálica e há uma correlação positiva bastante forte ( $r = 0.80$ ) entre níveis séricos e cerebrais de NT-3, sugerindo que as alterações periféricas possam corresponder, pelo menos em parte, às modificações do NT-3 central [12]. Segundo, embora tenha sido relatado que os antidepressivos [19], mas não os antipsicóticos [8] possam alterar os níveis de NT-3, pouco se sabe dos efeitos de outros agentes psicotrópicos sobre o NT-3. Logo, não podemos descartar os efeitos de medicações nos resultados deste estudo. Estudos posteriores comparando níveis de NT-3 em pacientes medicados e não medicados poderão elucidar esta questão.

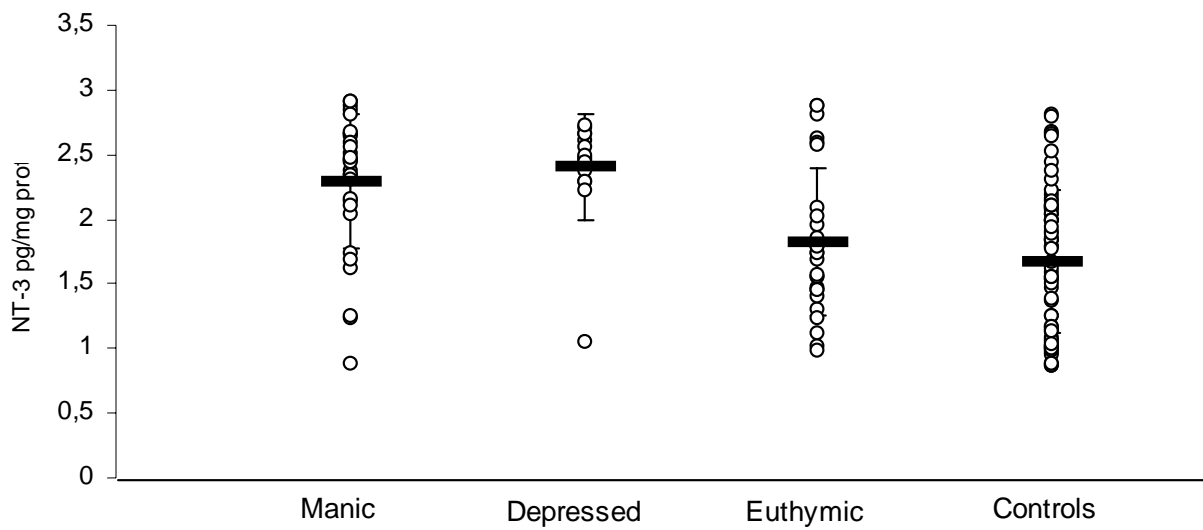
Concluindo, nós encontramos que os níveis séricos de NT-3 estão aumentados em nos pacientes com THB durante episódios maníacos e depressivos, se comparados aos pacientes eutímicos e controles. O presente achado sugere que o NT-3 possa ser produzido e/ou secretado em resposta á

tensão associada com os episódios agudos de humor, e sustenta mais a hipótese de que as neurotrofinas estão envolvidas na fisiopatologia do THB.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado em parte pela CAPES e CNPq.





**Figure 1.** Increase NT-3 serum levels in manic and depressed bipolar patients in comparison with healthy controls. \*ANOVA and Tukey post test. Different letters representation significant differences,  $p < 0.01$ .

**Table 1.** Clinical and demographic characteristics of bipolar patients and healthy controls

|   | Healthy              | <i>Bipolar Patients</i> |                   |                       | <i>P</i> |
|---|----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
|   | Controls<br>(n = 80) | Euthymic<br>(n = 30)    | Manic<br>(n = 31) | Depressed<br>(n = 19) |          |
| Gender  |                      |                         |                   |                       |          |
| Female  | 56.3%                | 50.0%                   | 45.2%             | 48.0%                 | 0.555*   |
| Male  | 43.8%                | 50.0%                   | 54.8%             | 52.0%                 |          |
| Mean age<br>(Years, S.D.)                     | 41.73(10.63)         | 41.63(9.51)             | 39.53(12.70)      | 43.42(8.00)           | 0.638**  |
| Number of<br>medications (Mean,<br>S.D.)      | -                    | 2.93(1.23)              | 3.41(1.40)        | 2.66(0.96)            | 0.106**  |
| Number of<br>hospitalizations<br>(Mean, S.D.) | -                    | 4.69(5.42)              | 4.39(5.52)        | 7.26(7.57)            | 0.241**  |
| Number of suicide<br>attempts (Mean,<br>S.D.) | -                    | 1.95(1.70)              | 1.60(0.89)        | 3.86(3.03)            | 0.033**  |
| Age of first episode<br>(Mean, S.D.)          | -                    | 24.68(11.60)            | 25.61(10.92)      | 21.47(10.36)          | 0.428**  |
| Length of illness<br>(Years, S.D.)            | -                    | 16.25(10.39)            | 14.93(11.21)      | 22.74(10.71)          | 0.055**  |
| CGI (Mean, S.D.)                              | -                    | 3.53(1.65)              | 5.55(0,64)        | 4.05(1.03)            | 0.001**  |
| GAF (Mean, S.D.)                              | -                    | 60.76(13.45)            | 35.00(7.30)       | 55.94(9.76)           | 0.001**  |
| HAM-D (Mean, S.D.)                            | -                    | 5.65(3.37)              | 11.46(9.40)       | 16.89(7.51)           | 0.001**  |
| YMRS (Mean, S.D.)                             | -                    | 5.16(5.26)              | 34.19(8.24)       | 5.15(4.68)            | 0.001**  |

\* Chi-square test; \*\* One-way ANOVA test; CGI = Clinical Global Impression; GAF = Global Assessment of Functioning; HAM-D = Hamilton Depression Rating Scale; YMRS = Young Mania Rating Scale

## Referencias Bibliográficas

[1] K. Agerman, P. Ernfors. Differential influence of BDNF and NT3 on the expression of calcium binding proteins and neuropeptide Y in vivo, *Neuroreport*. 14(2003) 2183-2187.

[2] R.H. Belmaker. Bipolar disorder, *N Engl J Med*. 351 (2004) 476-486.

[3] A.B. Cunha, B.N. Frey, A.C. Andreazza, J.D. Godói, A.R. Rosa, C.A. Gonçalves, A. Santin, F. Kapczinski. Serum brain-derived neurotrophic is decreased in bipolar disorder during depressive and maniac episodes, *Neurosci Lett*. 398 (2006) 215-219.

[4] M.B. First, R.L. Spitzer, M. Gibbon, J.B. Williams. Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I), Biomedics Research Department, New York, 1998.

[5] K.M. Giehl, S. Röhrig, H. Bonatz, M. Gutjahr, B. Leiner, I. Bartke, Q. Yan, L.F. Reichardt, C. Backus, A. A. Welcher, K. Dethleffsen, P. Mestres, M. Meyer. Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 Antagonistically Regulate Survival of Axotomized Corticospinal Neurons *In Vivo*, *J Neurosci*. 21(2001) 3492–3502.

[6] M. Hamilton. A rating scale for depression, *J Neurol, Neurosurg Psychiatry*. 23 (1960) 56-62.

[7] K. Hashimoto, E. Shimizu, M. Iyo. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Research, Brain Res Rev*. 45 (2004) 104-114.

[8] A.M. Linden, J. Vaisanen, M. Lakso, H. Nawa, G. Wong, E. Castren. Expression of Neurotrophins in rat brain after administration of antipsychotic and psychotropic agents, *J Mol Neurosci.* 14(2000) 27-37.

[9] R. Machado-Vieira, M.O. Dietrich, R. Leke, V.H. Cereser, V. Zanatto, F. Kapczinski, D.O. Souza, L.V. Portela, V. Gentil. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode, *Biolog Psychiatry.* In press.

[10] L. Minichiello, R. Klein. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons, *Genes Dev.* 10 (1996) 2849-2858.

[11] D. Ongur, W.C. Drevets, J.L. Price. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders, *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 (1998) 13290-13295.

[12] W. Pan, W.A. Banks, A.J. Kastin. Permeability of the blood-brain barrier to neurotrophins, *Brain Res.* 788 (1998) 87-94.

[13] G. Rajkowska, A. Halaris, L.D. Selemon. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder, *Biolog Psychiatry.* 49 (2001) 741-752.

[14] G. Rajkowska. Depression: What we can learn from post mortem studies, *Neuroscientist.* 9 (2003) 273-284.

[15] A.R. Rosa, B.N. Frey, A.C. Andreazza, K.M. Cereser, A.B. Cunha, J. Quevedo, A. Santin, C. Gottfried, C.A. Gonçalves, E. Vieta, F. Kapczinski. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder, *Neurosci Lett.* 47(2006) 146-150.

[16] A. Schutte, Q. Yan, P. Mestres, K.M. Giehl. The endogenous survival promotion of axotomized rat corticospinal neurons by brain-derived neurotrophic factor is mediated via paracrine, rather than autocrine mechanisms, *Neurosci Lett.* 290(2000) 185-188.

[17] Y. Shirayama, A.C. Chen, S. Nakagawa, D.S. Russel, R.S. Duman. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression, *J Neurosci.* 22 (2002) 3251-3261.

[18] P. Sklar, SB. Gabriel, MG. McInnis, P. Bennett, YM. Lim, G.Tsan, S. Schaffner, G. Kirov, I. Jones, M. Owen, N. Craddock, J.R. DePaulo, E.S. Lander. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neurotrophic factor, *Mol Psychiatry.* 7(2002) 579-593.

[19] M.A. Smith, S. Makino, M. Altemus, D. Michelson, S.K. Hong, R. Kvetnansky, R.M. Post. Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus, *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (1995) 8788-8792.

[20] M. Takebayashi, K. Hisaoka, A. Nishida, M. Tsuchioka, I. Miyoshi, T. Koruzu, S. Hikasa, Y. Okamoto, H. Shinno, S. Morinobu, S. Yamawaki. Decreased levels of whole blood glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in remitted patients with mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 9 (2006) 607-612.

[21] RC Young, JT Biggs, VE Ziegler, DA Meyer. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry.* 133 (1978) 429-435.

## **Serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in animal model of mania**

Submitted to *Psychiatry Research*

Julio Walz<sup>a</sup>, Ana C. Andreazza<sup>a,b</sup>, Keila M. Ceresér<sup>a,c</sup>, Alice Cacilhas<sup>a</sup>, Benício N. Frey<sup>a,b</sup>, Samira Valvassori<sup>c</sup>, João Quevedo<sup>c</sup>, Flávio Kapczinski<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600- Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Av. Universitária, 1105. Zip code: 88806-000. Criciúma, SC, Brazil

\* Corresponding author: Flavio Kapczinski - Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Zip code: 90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: + 55 51 3222 7309. Fax: + 55 51 21018846. E-mail: kapcz@terra.com.br (F. Kapczinski).

## **Abstract**

It has been demonstrated that lithium and valproate, first line mood stabilizers, increase BDNF content in rat hippocampus and frontal cortex, which suggests that the regulation of neurotrophic factors might be associated with their pharmacological effects. In sight of the scarcity of studies with other neurotrophins, and the possible relevance of NT-3 in BD, here we investigate the effects of lithium and valproate on NT-3 levels in rat serum and hippocampus, in an animal model of mania induced by amphetamine. The use of amphetamine and mood stabilizers was associated with an increase in NT-3 levels in serum and hippocampus. The mood stabilizers Li and Valproate used before (prevention treatment) and after (reversal treatment) amphetamine changed the NT-3 levels. NT-3 levels in serum and hippocampus did not correlate. These results are in line with previous findings suggesting that mood stabilizers may present neurotrophic properties. Moreover, our findings add to the notion that mood stabilizers may exert some of their functions by reducing the impact of mood changes on the level of neurotrophins in certain brain regions. In the present study we have demonstrated that both Li and VPT modulate serum and central (hippocampal) NT-3 levels. The lack of correlation between serum and hippocampal levels of NT-3 raises a cautionary note about the validity of serum assessments of this neurotrophin as a means to infer about brain levels.

**Keywords:** animal model; bipolar disorder; mania; neurotrophin-3; pathophysiology

## Introduction

Bipolar disorder (BD) is a common, severe, and chronic illness associated with higher rates of suicide and general medical illnesses (Belmaker, 2004). BD is reported to occur within families and can be treated with pharmacological agents. However, the pathophysiology of BD remains largely unknown. One of the difficulties in the approach to the pathophysiology of BD is the paucity of animal modeling this disorder. Part of the problem is the fact that the disorder presents a complex picture, where phases of depression alternate with periods of mania and euthymia. Nevertheless, the unique hallmark of BD is acute mania (Belmaker, 2004). With this in mind and after a careful weighing of the literature on animal models of bipolar disorder (Machado-Vieira et al., 2004), we developed and validated an animal model of mania using a challenge with amphetamine (Frey et al., Life Sciences 2006; Frey et al., Bipolar Disorders, 2006). AMPH was chosen upon the fact that it is able to induce manic symptoms in both normal human volunteers (Strakowski and Sax., 1998) and BD subjects (Anand et al., 2000).

There is increasing evidence suggesting an involvement of neurotrophic factors in bipolar disorder (Hashimoto et al., 2004; Cunha et al., 2006, Rosa et al., 2006). More specifically, we have showed that serum BDNF is decreased (Cunha et al., 2006) while serum GDNF (Rosa et al., 2006) and serum NT-3 (Walz et al submitted) are increased during manic and depressive episodes in BD patients. Serum BDNF was negatively correlated with the severity of manic and depressive symptoms (Cunha et al., 2006). Furthermore, it has been demonstrated that lithium and valproate, first line mood stabilizers, increase BDNF content in rat



hippocampus and frontal cortex (Einat et al., 2003). When this dataset is considered, BDNF seem to be decreased in acute mood episodes but not in euthymia (Cunha, 2006; Machado-Vieira et al., 2006; Rosa et al. 2006). In order to add further information to this certainly incomplete mosaic of information, This study was designed to investigate the effects of lithium and valproate on NT-3 levels in serum and brain (hippocampus) in an animal model of mania.

## ***Material and Methods***

*Animals.* The experiments were performed in male Wistar rats (age: 3-4 months; weight: 220-310 g), obtained from our breeding colony. Rats were housed five to a cage, on a 12-h light/dark cycle (lights on between 7:00 a.m. – 7 p.m.), and food and water were available *ad libitum*. All experimental procedures were carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

*Reversal treatment.* The first model was designed in order to reproduce the management of a manic episode (reversal treatment). Animals received one daily IP injection of either D-amphetamine (AMPH - Sigma, St Louis, USA) 2mg/kg or saline for 14 days (45 animals per group). Between the 8th and the 14th day, saline and AMPH animals were divided in three experimental groups (15 animals per group): lithium (Li) treatment, valproate (VPT) treatment and saline (SAL) treatment. Li-treated animals received Li 47.5mg/kg IP twice a day, and VPT-treated animals received VPT 200mg/kg IP twice a day. Locomotor activity was measured 2h after the last injection, and the rats were sacrificed by decapitation right after the open field task. The decapitation blood was collected without anticoagulants, after that we centrifuge the blood in 3000 rpm for 15minutes. The hippocampus were dissected, rapidly frozen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. We sampled the hippocampus because of previous reports showing that BD patients have lower *N*-acetyl-aspartate, a marker neuronal viability, in the

hippocampus (Deicken et al., 2003; Bertolino et al., 2003), suggesting that BD may be associated with hippocampal dysfunction. All Li-treated animals of reversion and prevention experiments reached Li plasmatic levels between 0.6-1.2 mEq/L, as recommended for the treatment of BD patients.

*Prevention treatment.* The second model was designed to mimic the maintenance treatment used to prevent future episodes (prevention treatment). Animals received either Li 47.5mg/kg IP twice a day, VPT 200mg/kg IP twice a day or saline for 14 days (30 animals per group). Between the 8th and the 14th day, Li, VPT and saline-treated animals were divided in two experimental groups (15 animals per group): each treated group received one daily IP injection of either AMPH 2mg/kg or saline. Locomotor activity was measured 2h after the last injection, and the rats were sacrificed by decapitation right after the open field task. The decapitation blood was collected without anticoagulants, after that we centrifuge the blood in 3000rpm for 15minutes. The hippocampus were dissected, rapidly frozen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed.

*Locomotor activity.* The locomotor activity was assessed in the open-field task. The task was performed in a 40 x 60 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the open field was divided into 12 equal rectangles by black lines. The animals were gently placed on the left rear quadrant, in order to explore the arena for 5 minutes. Crossings of the black lines and rearings were counted.

*Biochemical measures.* NT-3 levels in serum and hippocampus samples were measured with sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer instructions (Chemicon, USA). Briefly, brain slices were homogenized in phosphate buffer solution (PBS) with 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1mM (EGTA). Microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24h with the samples diluted 1:2 in sample diluent for brain slices and 1:6 for serum and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of NT-3. Then, plates were washed four times with sample diluents and add monoclonal anti-NT-3 rabbit antibody diluted 1:1000 in sample diluent was incubated for 2 hours at room temperature. After washing, a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated diluted 1:1000 for 1h at room temperature was carried out. After addition of streptavidin-enzyme, substrate and stop solution the amount of NT-3 is determined for read of absorbance in 450nm. The standard curve demonstrates a direct relationship between Optical Density (OD) and NT-3 concentration. Total protein was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard. Serum Li levels were assessed in a commercial laboratory blind to the experiments.

*Statistical analysis.* All data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Differences among experimental groups in relation to control groups (saline or amphetamine) were determined by Dunnet test. *P* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. Correlation between serum and hippocampal NT-3 levels was determined using Pearson coefficient correlation.

## RESULTS

In the reversal treatment (figures 1A and 1B), AMPH and Li administration increased serum ( $F=16,45$ ;  $df=5,29$ ;  $p=0,001$ ) and hippocampal ( $F=21,77$ ;  $df= 5, 29$ ;  $p=0,021$ ) NT-3 levels in saline-pretreated rats. However when Li was administered to AMPH-pretreated rats, serum NT-3 was increased ( $F= 16,45$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,011$ ), while hippocampal NT-3 levels were not different from controls ( $p>0.05$ ). When VPT was administered to AMPH-pretreated animals VPT increased hippocampal NT-3 levels ( $F= 21,77$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,005$ ), while serum NT-3 levels were unchanged ( $p>0.05$  as compared to control rats).

In the prevention treatment (figures 2A and 2B) Li and AMPH increased serum ( $F=5,011$ ;  $df= 5,29$ ;  $p=0,002$ ) and hippocampal NT-3 ( $F=9,12$ ;  $df=5,29$ ;  $p=0,041$ ) levels in saline-treated rats, while VPT increased hippocampal but not serum NT-3 levels in saline-treated rats. When AMPH was administered to Li-pretreated rats, hippocampal NT-3 levels was increased ( $F= 9,12$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,011$ ), while serum NT-3 levels were unchanged ( $p>0.05$ ), and when AMPH was administered to VPT-pretreated rats, both serum ( $F=5,011$ ;  $df= 5,29$ ;  $p<0,001$ ) and hippocampal ( $F= 9,12$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,023$ ) NT-3 levels were increased.

No correlation between serum and hippocampal NT-3 levels were found.

## **DISCUSSION**

The present study showed that, in an animal model of mania using amphetamine (AMPH), AMPH raises levels of NT-3 in serum and in brain. This response was differentially changed by the use of lithium and valproate either before the use of AMPH (prevention treatment) or after the use of AMPH (reversal treatment). Lithium induced an increase in NT-3 in all conditions. The same pattern was observed in one occasion where NT-3 was increased after VPT infusion.

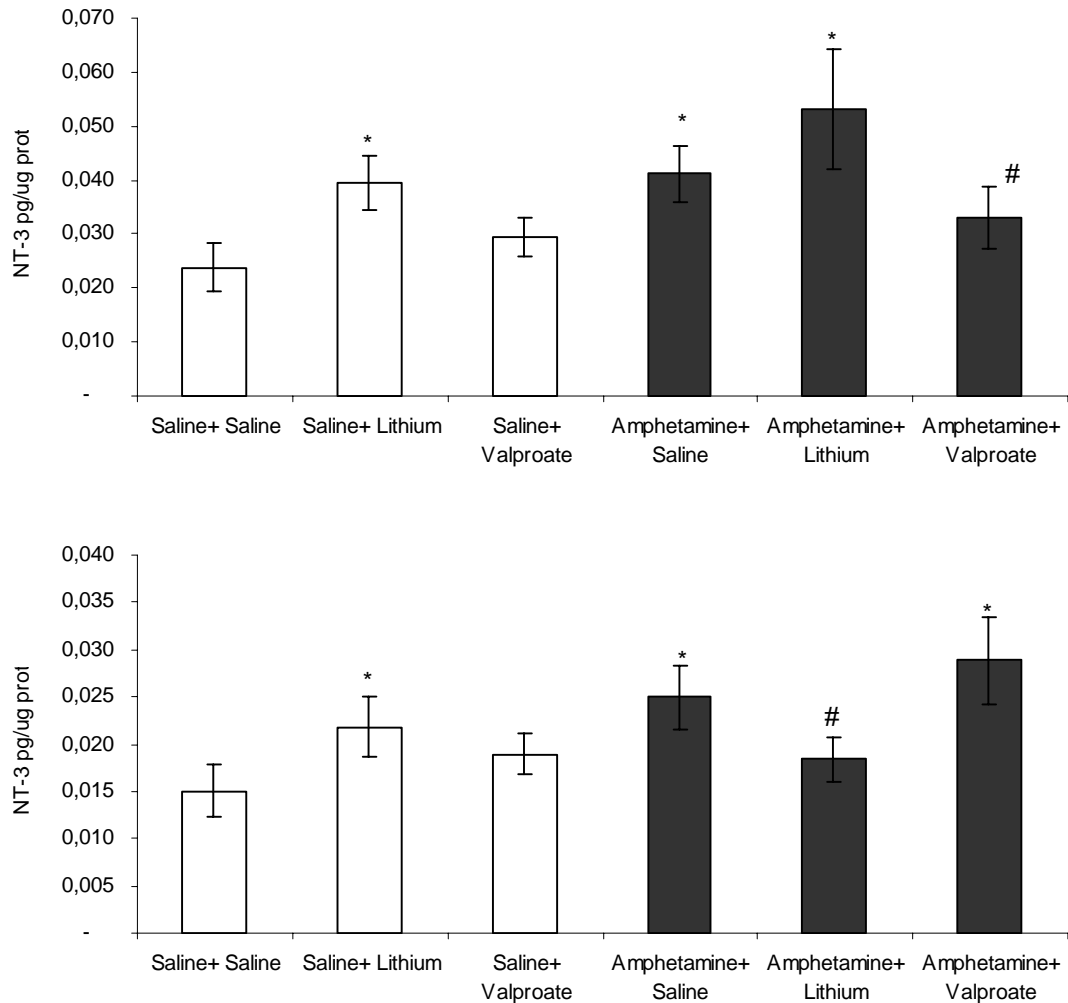
Recent studies suggest that levels of neurotrophic factors oscillate in an orchestrated fashion during the course of acute mood episodes and euthymic phases. For instance, serum BDNF is reduced in bipolar depression and mania (Cunha et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2006), while serum GDNF is increased during mania and bipolar depression (Rosa et al., 2006). It is noteworthy that neurotrophic factors seem to be altered only during the course of acute mood states, while stabilized (euthymic) patients present neurotrophic factors in the same levels as controls (Cunha et al., 2006; Rosa et al., 2006). It has been reported that NT-3 is temporally and spatially expressed in the place of BDNF in some neuronal populations to compensate for the loss of BDNF (Agerman and Enrfors, 2003). These compensatory effects between NT-3 and BDNF were demonstrated by the fact that the critical role of these neurotrophins in the survival of hippocampal and cerebellar granule cells are revealed only when the signaling of both neurotrophins are blunted (Minichiello and Klein, 1996). Further, NT-3 infusion increase BDNF mRNA expression in the cerebral cortex (Schutte et al., 2000), and produces BDNF-like effects inducing cortical TrkB phosphorylation

(Rosa et al., 2006). Therefore, we are tempted to speculate that this increment of serum NT-3 levels observed in the present study occurs in tandem with the lowering in BDNF serum levels described previously (Cunha et al., 2006). Such an increase in NT-3 could act as a compensatory physiological response to the strain imposed by mood episodes. This is in line with previous findings which showed that in the dentate gyrus and locus coeruleus (Smith et al., 1995) a NT-3 infusion attenuated the correlates of disordered mood induced by the learned helplessness and forced swim test paradigms (Shirayama et al., 2002).

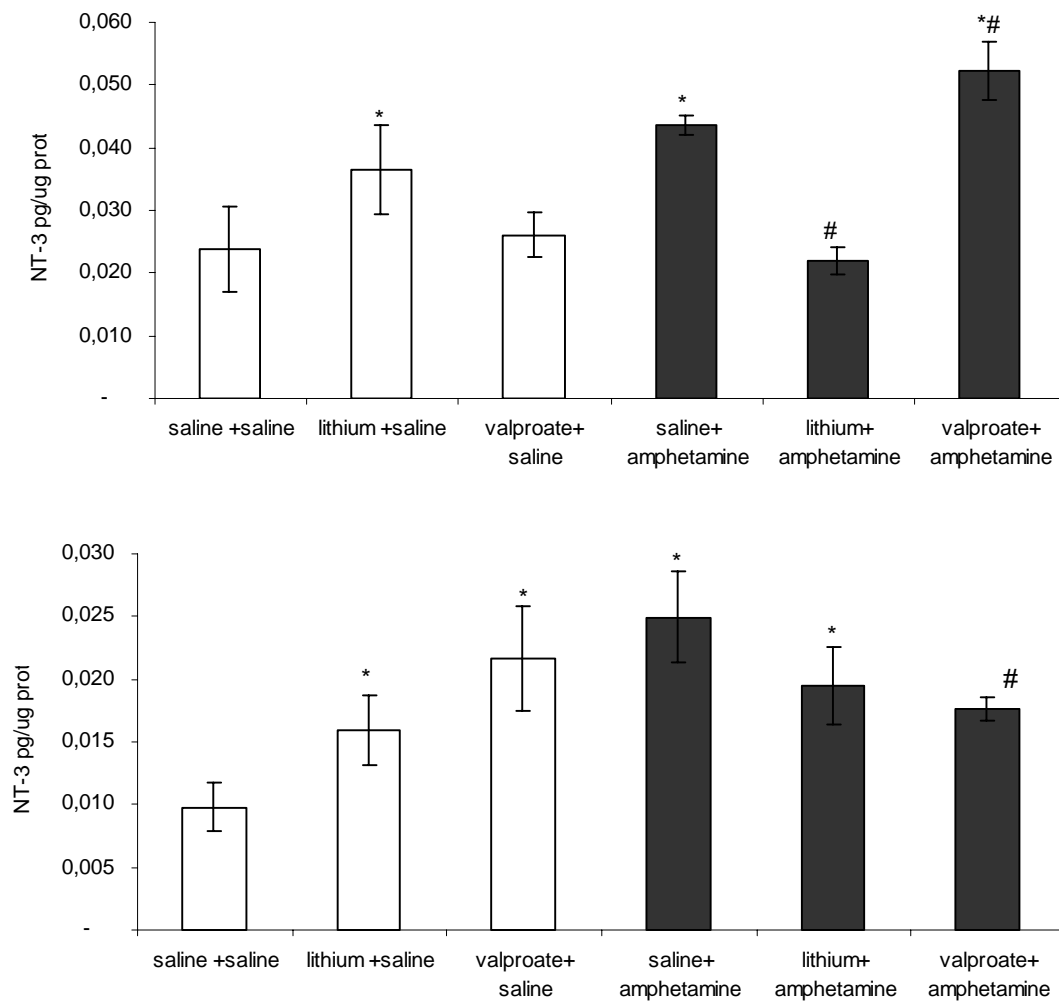
Neurotrophic factors contribute to the growth, development, and plasticity of selective neuronal populations in the nervous system acting via their high-affinity receptors in specific nerves cells to influence their survival and gene expression. NT-3 couples to the same signal transduction pathways as BDNF through their respective receptors, and decreased expression of these factors could lead to alterations in the structure and function of subpopulations of hippocampal neurons, depending on the complements of receptors that are expressed in each cell type (Duman and Monteggia, 2006). In addition, it has been reported that NT-3 modulates basal synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampus (Kato, 2003). Little attention has been paid to the study of NT-3 on neuropsychiatric disorders, and some studies have shown a down-regulation of NT-3 mRNA in cerebral ischemia, seizures, and brain trauma (Gall, 1993; Lindvall et al., 1992; Hicks et al 1997). In BD, we have recently found that serum NT-3 (Walz et al submitted) and serum GDNF levels (Rosa et al., 2006) are increased during manic and depressive episodes. Conversely, serum BDNF is decreased

during manic and depressive states (Cunha et al., 2006). In the present study we demonstrate that both Li and VPT modulate serum and central (hippocampal) NT-3 levels, although the level in blood and hippocampus did not correlate.





**Figure 1.** Serum (A) and hippocampal (B) NT-3 levels in reversal treatment. Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M.; White bars represent saline (1-7 day) + saline or mood stabilizers (8-14 day) and black bars represent amphetamine (1-7 day) + saline or mood stabilizers (8-14 day). \* Groups (white and black bars) were compared to saline+saline (control group); # Black bars was compared to amphetamine+saline group.



**Figure 2.** Serum (A) and hippocampal (B) NT-3 levels in prevention treatment. Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M.; White bars represent mood stabilizers (1-7 day) + saline (8-14 day) and black bars represent saline or mood stabilizers (1-7 day)+ amphetamine. (8-14 day). \* Groups (white and black) were compared to saline+saline (control group); # Black bars was compared to amphetamine + saline group.

## References

Agerman K, Ernfors P. Differential influence of BDNF and NT3 on the expression of calcium binding proteins and neuropeptide Y in vivo. *Neuroreport* 2003 ;14 :2183-2187.

Anand A, Verhoeff P, Seneca N, Zoghbi SS, Seibyl JP, Charney DS, Innis RB.et al., Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *The American Journal of Psychiatry* 2000;157:1108-1114.  
Belmaker, RH. Bipolar disorder. *The New England Journal of Medicine* 2004;351:476-486.

Bertolino A, Frye M, Callicott JH, Mattay VS, Rakow R, Shelton-Repella J, Post R, Weinberger DR. Neuronal pathology in the hippocampal area of patients with bipolar disorder: a study with proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Biological Psychiatry* 2003;53:906-913.

Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Godói JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic is decreased in bipolar disorder during depressive and maniac episodes. *Neuroscience Letters* 2006;398:215-219.

Deicken RF, Pegues MP, Anzalone S, Feiwell R, Soher B. Lower concentration of hippocampal N-acetylaspartate in familial bipolar I disorder. *The American Journal of Psychiatry* 2003;160:873-882.

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biology Psychiatry*. 2006;59:1116-1127.

Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G. The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in mood modulation. *Journal of Neuroscience* 2003;23:7311-7316

Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences* 2006;79:281-286

Frey BN, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disorder* 2006;8:275-280.

Gall CM. Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. *Experimental Neurology* 1993;124:150–166.

Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Research Reviews* 2004;24:104-114.

Hicks R.R, Numan S, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB. Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Molecular Brain Research* 1997; 48:401–406.

Kato A, Fukuzawa Y, Ozawa , inokuchi K, Sugiyama H. Activation of ERK cascade promotes accumulation of Vesi1S/Homer-1a immunoreactivity at synapses. *Brain Research Molecular Brain Research* 2003;118:33-34.

Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjo BK, Persson H. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992;89:648–652.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2004;76:805-11.

R. Machado-Vieira, M.O. Dietrich, R. Leke, V.H. Cereser, V. Zanatto, F. Kapczinski, D.O. Souza, L.V. Portela, V. Gentil. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode. *Biolog Psychiatry* 2006 In press.

L. Minichiello, R. Klein. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Development* 1996;10:2849-2858.

Rosa AR, Frey BN, Andrezza AC, Cereser KM, Cunha AB, Quevedo J, Santin A, Gottfried C, Gonçalves CA, Vieta E, Kapczinski F. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 2006; 47:146-150.

Schutte A, Yan Q, Mestres P, Giehl KM. The endogenous survival promotion of axotomized rat corticospinal neurons by brain-derived neurotrophic factor is mediated via paracrine, rather than autocrine mechanisms. *Neuroscience Letters* 2000;290:185-188.

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russel DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *Journal of Neurosciences* 2002;22:3251-3261.

Smith MA, Makino S, Altemus M, Michelson D, Hong SK, Kvetnansky R, Post RM. Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1995;92:8788-8792.

Strakowski SM, Sax KW. Progressive behavioral response to repeated d-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. *Biological Psychiatry* 1998;1171-1177.

## **Níveis Séricos e Hipocampais de Neurotrofina-3 em modelo animal de mania**

Julio Walz<sup>a</sup>, Ana C. Andreazza<sup>a,b</sup>, Keila M. Ceresér<sup>a,c</sup>, Alice Cacilhas<sup>a</sup>, Benício N. Frey<sup>a,b</sup>, Samira Valvassori<sup>c</sup>, João Quevedo<sup>c</sup>, Flávio Kapczinski<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600- Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Av. Universitária, 1105. Zip code: 88806-000. Criciúma, SC, Brazil

\* Corresponding author: Flavio Kapczinski - Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Zip code: 90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: + 55 51 3222 7309. Fax: + 55 51 21018846. E-mail: kapcz@terra.com.br (F. Kapczinski).

## Resumo

Tem sido demonstrado que lítio e VPT, estabilizadores de humor de primeira linha, aumentam o conteúdo BDNF no HIPO e córtex pré-frontal de ratos, o que sugere que a regulação dos fatores neurotróficos possa estar associada com seus efeitos farmacológicos. A vista da escassez de estudos com outras neurotrofinas, e a possível relevância do NT-3 no THB, investigamos os efeitos do lítio e VPT nos níveis de NT-3 no soro e HIPO dos ratos em um modelo animal de mania, induzido por ANF. O uso de ANF e estabilizadores de humor foram associados com aumento de níveis séricos e hipocampais de NT-3. Estabilizadores de humor Li e VPT usados antes (tratamento preventivo) e depois (tratamento de reversão) da ANF, alterou níveis de NT-3. Os níveis deste no soro e HIPO não se correlacionam. Estes resultados estão de acordo com achados prévios, sugerindo que estabilizadores de humor possam apresentar propriedades neurotróficas. Além disto, nossos achados acrescem à noção que os estabilizadores do humor possam exercer alguma de suas funções pela redução do impacto das mudanças de humor no nível de neurotrofinas em certas regiões do cérebro. No presente estudo, demonstramos que tanto o Li quanto VPT modulam níveis séricos e centrais (hipocampais) de NT-3. A falta de correlação entre níveis séricos e hipocampais de NT-3 levanta uma nota de cautela sobre a validade da avaliação sérica desta neurotrofina como meio de inferência de níveis cerebrais.

Unitermos: modelo animal; transtorno do humor bipolar; mania; neurotrofina-3; fisiopatologia.

## **Introdução**

Transtorno do Humor Bipolar (THB) é uma doença comum, grave e crônica, associada a altos índices de suicídio e doenças clínicas (Belmaker, 2004). THB é referido como ocorrendo em famílias e pode ser tratada com agentes farmacológicos. Entretanto, a fisiopatologia do THB continua amplamente desconhecida. Uma das dificuldades de abordagem da fisiopatologia do THB é a falta de um modelo animal nesta doença. Parte dos problemas é o fato que este transtorno apresentar um quadro complexo, onde fases de depressão se alternam com períodos de mania e eutímia. De qualquer forma, a marca do THB é a mania aguda (Belmaker, 2004). Com isto em mente e depois de cauteloso exame da literatura sobre modelo animal no THB (Machado-Vieira et al, 2004), desenvolvemos e validamos um modelo animal de mania usando como estimulante a ANF (Frey et al., Life Sciences 2006, Frey et al., Bipolar Disorders, 2006). Esta escolha foi baseada no fato da ANF ser capaz de induzir sintomas maníacos tanto em voluntários humanos normais (Strakowski and Sax, 1998) quanto em pacientes com THB (Anand et al., 2000)

Há um aumento de evidências sugerindo o envolvimento de fatores neurotróficos no THB (Hashimoto et al., 2004; Cunha et al. 2006, Rosa et al, 2006). Mais especificamente, mostramos que o BDNF sérico está diminuído (Cunha et al., 2006) enquanto GDNF (Rosa et al., 2006) e NT-3 (Walz et al submitted) séricos estão aumentados durante episódios maníacos e depressivos em pacientes com THB. BDNF sérico foi negativamente correlacionado com a severidade dos sintomas maníacos e depressivos (Cunha et al., 2006). Além disto, foi demonstrado que o Li e o VPT, estabilizadores de primeira linha, aumentam o



conteúdo de BDNF no HIPO e córtex frontal de ratos.(Einat et al., 2003). Quando estes dados são considerados, BDNF parece estar diminuído em episódios agudos de humor, mas não na eutímia (Cunha et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2006; Rosa et al., 2006). Para acrescentar mais informações a este, certamente, incompleto mosaico de informações, delineamos este estudo para investigar os efeitos do Li e do VPT nos níveis séricos e cerebrais (HIPO) de NT-3 em um modelo animal de mania.

### **Material e Métodos**

**Animais.** Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos (idade: 3-4 meses; peso: 220-310 g), obtidos do nosso biotério. Os ratos foram criados em 5 por gaiola, num ciclo de claro/escuro de 12hs (luzes ligadas entre 7:00 e 19:00), água e comida disponíveis à vontade. Todos os experimentos foram feitos de acordo com o NIH Guia de Cuidados e usos de Animais de Laboratório e as recomendações para cuidados animais da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC).

**Tratamento Agudo.** O primeiro modelo foi designado na forma de que reproduza a gênese de um episódio agudo de mania (tratamento de reversão-figura 1). Os animais receberam uma injeção diária de 2mg/Kg de D-ANF (AMPH-Sigma, St Luis, USA) ou salina por 15 dias (45 animais por grupo). Entre o oitavo e o décimo quarto dia, os animais dos grupos salina e AMPH foram divididos em 3 grupos experimentais (15 animais por grupo): Tratamento com Li (Li), tratamento com VPT (VTP) e tratamento com salina (SAL). Animais tratados com Li receberam

47,5mg/Kg IP duas vezes ao dia, e animais tratados com VTP receberam IP de 200mg/Kg duas vezes ao dia. Atividade locomotora foi medida 2h depois da última injeção, e os ratos foram sacrificados por decapitação logo após o teste em campo aberto. O sangue foi coletado logo após a decapitação sem anticoagulante, depois disso nós centrifugamos o sangue por 15 minutos a 3000 rpm. HIPO foi dissecado, rapidamente congelado e armazenado em freezer -80°C até ser testado.

**Tratamento de Manutenção.** O segundo modelo foi criado para imitar a fase de manutenção do tratamento BD (tratamento de prevenção- figura 2). Os animais receberam IP 47,5mg/Kg de Li duas vezes ao dia, ou IP de VTP 200mg/Kg duas vezes ao dia ou salina durante 14 dias (30 animais por grupo). Entre o oitavo e o décimo quarto dia, animais tratados com Li, VTP e Salina foram divididos em dois grupos experimentais (15 animais por grupo): cada grupo tratado recebeu uma injeção diária IP de 2mg/Kg de AMPH ou salina. Atividade locomotora foi medida 2h após a última injeção e os ratos foram decapitados logo após o teste de campo aberto. O sangue da decapitação foi coletado sem anticoagulante, depois disso o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 3000rpm. O HIPO foi dissecado, rapidamente congelado e armazenado em freezer -80°C até ser testado.

**Atividade Locomotora.** A atividade locomotora foi acessada pelo teste de campo aberto. O teste foi representado em um campo aberto de 40 x 60 cm cercado por paredes de 50 cm de altura feita de madeira compensada marrom com uma parede frontal de vidro. O chão do campo aberto foi dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. O animal foi gentilmente colocado no quadrante esquerdo

de fundo, no objetivo de explorar a arena por 5 minutos. Cruzamentos das linhas pretas foram contados.

**Testes Bioquímicos.** Níveis de NT-3 em amostras de soro e HIPO foram dosados por ELISA de captura, usando um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon, USA). Resumindo, as fatias cerebrais foram homogeneizadas em Tampão de solução fosfato (PBS) com 1mM de fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF) e 1mM de EGTA. As placas (com 96 poços) foram revestidas por 24h com as amostras diluídas em 1:2 de diluente de amostra para amostras cerebrais e 1:6 para soro e a curva padrão variou de 7,8 a 500 pg de NT-3. Então, os poços foram lavados quatro vezes com diluentes de amostra e foram adicionados anticorpo monoclonal de coelho anti-NT-3 diluídos em 1:1000 por 1h a temperatura ambiente. Depois de adicionar a enzima streptavidina, substrato e solução de parada, a quantidade de NT-3 foi determinada através de leitura de absorvância em 450nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre Densidade Óptica (OD) e concentração de NT-3. Proteínas totais foram dosadas pelo método de Lowry utilizando albumina sérica bovina como padrão. Níveis séricos de Li foram acessados em um Laboratório comercial cego aos experimentos.

**Análises Estatísticas.** Todos os dados foram apresentados com sendo +- S.E.M. Diferenças entre os grupos experimentais em relação aos grupos controles (salina ou ANF) foram determinados pelo Teste de Dunnet. Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados indicadores de significância estatística. A correlação

entre níveis séricos e Hipocampais de NT-3 foram determinados usando o coeficiente de correlação de Pearson.

## Resultados

No tratamento de reversão (figuras 1A e 1B), a administração de AMPH e Li aumentaram níveis sérico ( $F=16,45$ ;  $df=5,29$ ;  $p=0,001$ ) e hipocampal ( $F=21,77$ ;  $df= 5, 29$ ;  $p=0,021$ ) de NT-3 em ratos pré-tratados com solução salina. Entretanto, quando o Li foi administrado a ratos pré-tratados com AMPH, o NT-3 sérico foi aumentado ( $F= 16,45$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,011$ ), enquanto níveis de NT-3 no HIPO não eram diferentes do controle ( $p>0.05$ ). Quando VPT foi administrado a animais pré-tratados com AMPH, VPT aumentam níveis de NT-3 no HIPO ( $F= 21,77$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,005$ ), enquanto níveis séricos de NT-3 não modificaram ( $p>0.05$  se comparados a ratos controles).

No tratamento de prevenção (figuras 2A e 2B), Li e AMPH aumentam níveis séricos ( $F=5,011$ ;  $df= 5,29$ ;  $p=0,002$ ) e hipocampais de NT-3 ( $F=9,12$ ;  $df=5,29$ ;  $p=0,041$ ) em ratos tratados com solução salina, enquanto o VPT aumenta níveis hipocampais, mas não séricos, de NT-3. Quando AMPH foi administrada a ratos pré-tratados com Li, NT-3 hipocampal foi aumentado ( $F= 9,12$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,011$ ), enquanto níveis séricos de NT-3 permaneceram inalterados ( $p>0.05$ ), e quando AMPH foi administrada a ratos pré-tratados com VPT tanto níveis séricos ( $F=5,011$ ;  $df= 5,29$ ;  $p<0,001$ ) quanto hipocampais ( $F= 9,12$ ;  $df= 5,29$ ;  $p= 0,023$ ) de NT-3 foram aumentados.

Não foi encontrada correlação entre os níveis séricos e hipocampais de NT-3.

## **Discussão**

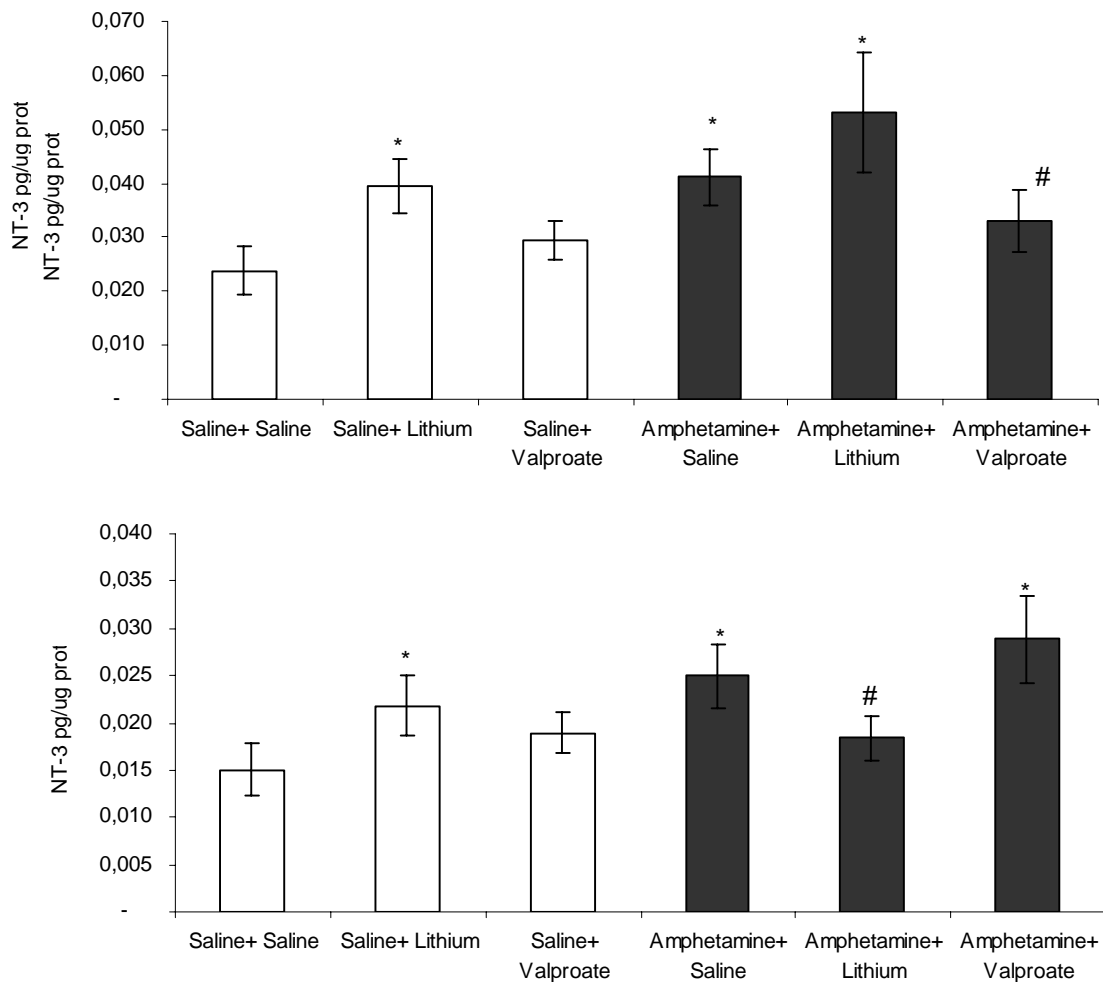
O presente estudo mostrou que, em modelo animal de mania usando ANF, os níveis séricos e cerebrais de NT-3 estão aumentados. Esta resposta foi distintamente alterada pelo uso de Li e VPT tanto antes do uso de AMPH (tratamento de prevenção), como após o uso de AMPH (tratamento de reversão). Li induziu um aumento de NT-3 em todas as condições. O mesmo padrão foi observado na ocasião em que o NT-3 estava aumentado após a infusão de VPT.

Estudos recentes sugerem que níveis de fatores neurotróficos oscilam de uma forma orquestrada durante o curso de um episódio agudo de humor e durante a eutímia. Por exemplo, BDNF sérico está reduzido na depressão bipolar e na mania (Cunha et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2006), enquanto GDNF sérico está aumentado durante a mania e a depressão bipolar (Rosa et al., 2006). É digno de nota que os fatores neurotróficos pareçam estar alterados apenas durante o curso dos estados de humor agudos, enquanto pacientes estabilizados (eutímicos) apresentam fatores neurotróficos nos mesmos níveis que os controles (Cunha et al., 2006; Rosa et al., 2006). Tem sido descrito que o NT-3 é temporariamente e espacialmente expresso no lugar do BDNF em algumas populações neuronais, para compensar a perda do BDNF (Agerman and Enrfors, 2003). Estes efeitos compensatórios entre NT-3 e BDNF foram demonstrado pelo fato de que o papel crítico destas neurotrofinas na sobrevivência das células granulares cerebelares e hipocampais são reveladas somente quando a sinalização de ambas as neurotrofinas está embotada (Minichiello and Klein, 1996). Além disto, a infusão de NT-3 aumenta a expressão do RNAm do BDNF no córtex cerebral (Schutte et al., 2000), e produz efeitos “tipo BDNF” induzindo a

fosforilação do TrkB cortical (Rosa et al., 2006). Logo, estamos tentados a especular que o incremento nos níveis de NT-3 observados neste estudo ocorrem em *tandem* com a diminuição de níveis séricos de BDNF descritos previamente (Cunha et al., 2006). Este aumento pode agir como uma resposta fisiológica compensatória à tensão provocada pelos episódios de humor. Isto está de acordo com achados prévios que mostram que no giro dentado e no *locus coeruleus* (Smith et al., 1995) uma infusão de NT-3 atenua os sintomas relacionados à transtorno de humor induzido pelos paradigmas de abandono e nado forçado (Shirayama et al., 2002).

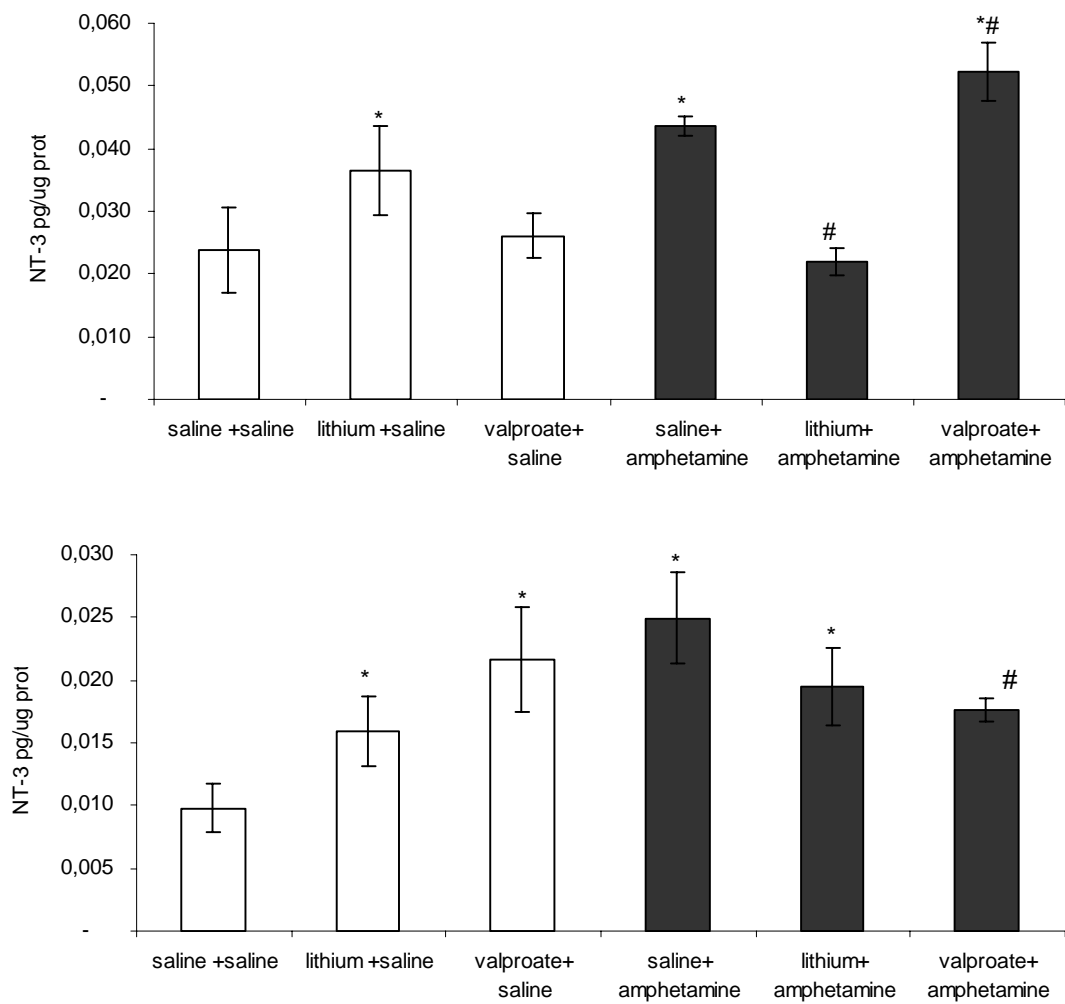
Fatores neurotróficos contribuem para o crescimento, desenvolvimento e plasticidade de população seletivas de neurônios no sistema nervoso, agindo via seus receptores de alta afinidade em células nervosas específicas para influenciar sua sobrevivência e expressão gênica. NT-3 se acopla aos mesmos caminhos de transdução de sinal do BDNF, através dos seus respectivos receptores, e a diminuição da expressão destes fatores pode levar a alterações na estrutura e funcionamento de sub-população de neurônios hipocámpais, dependendo dos complementos dos receptores que são expressos em cada tipo de célula (Duman and Monteggia, 2006). Além disso, tem sido descrito que o NT-3 modula a transmissão sináptica basal e a potenciação prolongada no HIPO dos ratos (Kato, 2003). Pouca atenção foi dada ao estudo do NT-3 nas doenças psiquiátricas, e alguns estudos mostraram uma regulação negativa do RNAm do NT-3 na isquemia cerebral, convulsões e trauma cerebral (Gall, 1993; Lindvall et al., 1992; Hicks et al., 1997). No THB, recentemente achamos que os níveis de NT-3 (Walz et al., no prelo) e de GDNF séricos (Rosa et al, 2006) estão aumentados durante episódios

maníacos e depressivos. Opostamente, níveis séricos de BDNF estão diminuídos em estados maníacos e depressivos (Cunha et al, 2006). No presente estudo, demonstramos que tanto Li e VPT modulam níveis de NT-3 sérico e central (HIPO), embora os níveis sanguíneos e hipocampal não se correlacionem.



**Figura 1.** Níveis de NT-3 sérico (A) e hipocámpal (B) no tratamento reverso. Resultados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M; Barras brancas representam salina (1-7 dias)+ salina ou estabilizantes do humor (8-14 dias) e barras pretas representam ANF (1-7 dias) + salina ou estabilizantes do humor (8-14 dias). \* Os grupos (barras brancas e pretas) foram comparados a salina+salina (grupo controle); # Barras pretas foram comparadas ao grupo ANF+salina.





**Figura 2.** Níveis de NT-3 sérico (A) e hipocampal (B) no tratamento preventivo. Resultados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M; Barras brancas representam estabilizantes do humor (1-7 dias)+ salina (8-14 dias) e barras pretas representam salina ou estabilizantes do humor (1-7 dias) + ANF (8-14 dias). \* Os grupos (barras brancas e pretas) foram comparados a salina+salina (grupo controle); # Barras pretas foram comparadas ao grupo ANF+salina.

## REFERENCIAS

Agerman K, Ernfors P. Differential influence of BDNF and NT3 on the expression of calcium binding proteins and neuropeptide Y in vivo. *Neuroreport* 2003 ;14 :2183-2187.

Anand A, Verhoeff P, Seneca N, Zoghbi SS, Seibyl JP, Charney DS, Innis RB.et al., Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *The American Journal of Psychiatry* 2000;157:1108-1114.  
Belmaker, RH. Bipolar disorder. *The New England Journal of Medicine* 2004;351:476-486.

Bertolino A, Frye M, Callicott JH, Mattay VS, Rakow R, Shelton-Repella J, Post R, Weinberger DR. Neuronal pathology in the hippocampal area of patients with bipolar disorder: a study with proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Biological Psychiatry* 2003;53:906-913.

Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Godói JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic is decreased in bipolar disorder during depressive and maniac episodes. *Neuroscience Letters* 2006;398:215-219.

Deicken RF, Pegues MP, Anzalone S, Feiwell R, Soher B. Lower concentration of hippocampal N-acetylaspartate in familial bipolar I disorder. *The American Journal of Psychiatry* 2003;160:873-882.

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biology Psychiatry*. 2006;59:1116-1127.

Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G. The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in mood modulation. *Journal of Neuroscience* 2003;23:7311-7316

Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences* 2006;79:281-286

Frey BN, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disorder* 2006;8:275-280.

Gall CM. Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. *Experimental Neurology* 1993;124:150-166.

Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Research Reviews* 2004;24:104-114.

Hicks R.R, Numan S, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB. Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Molecular Brain Research* 1997; 48:401–406.

Kato A, Fukuzawa Y, Ozawa , inokuchi K, Sugiyama H. Activation of ERK cascade promotes accumulation of Vesi1S/Homer-1a immunoreactivity at synapses. *Brain Research Molecular Brain Research* 2003;118:33-34.

Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjo BK, Persson H. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992;89:648–652.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2004;76:805-11.

R. Machado-Vieira, M.O. Dietrich, R. Leke, V.H. Cereser, V. Zanatto, F. Kapczinski, D.O. Souza, L.V. Portela, V. Gentil. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode. *Biolog Psychiatry* 2006 In press.

L. Minichiello, R. Klein. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Development* 1996;10:2849-2858.

Rosa AR, Frey BN, Andrezza AC, Cereser KM, Cunha AB, Quevedo J, Santin A, Gottfried C, Gonçalves CA, Vieta E, Kapczinski F. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 2006; 47:146-150.

Schutte A, Yan Q, Mestres P, Giehl KM. The endogenous survival promotion of axotomized rat corticospinal neurons by brain-derived neurotrophic factor is mediated via paracrine, rather than autocrine mechanisms. *Neuroscience Letters* 2000;290:185-188.

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russel DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *Journal of Neurosciences* 2002;22:3251-3261.

Smith MA, Makino S, Altemus M, Michelson D, Hong SK, Kvetnansky R, Post RM. Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1995;92:8788-8792.

Strakowski SM, Sax KW. Progressive behavioral response to repeated d-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. *Biological Psychiatry* 1998;1171-1177.

## DISCUSSÃO

Como já destacamos anteriormente, este é o primeiro estudo experimental que procura verificar se o NT-3 está alterado no THB. Para tanto, avaliamos os níveis séricos de NT-3 em pacientes com THB nas fases agudas da doença, ou seja, mania e depressão, como também na eutimia e comparamos estes estados com controles hígidos. Após este experimento, seguimos nosso propósito buscando no modelo animal de mania induzido por D-ANF possibilidades de maiores informações acerca de nossos achados.

Os achados indicam uma associação entre os níveis elevados de NT-3 e a sintomatologia aguda de pacientes portadores de transtorno bipolar e que a dosagem sérica de NT-3 possa ser um marcador do estado afetivo de pacientes com THB. O possível envolvimento de NT-3 na fisiopatologia do THB, bem como um potencial alvo terapêutico da doença, são pontos importantes a serem investigados.

Um ponto importante que devemos destacar é que encontramos mais uma vez uma correlação entre o THB e o modelo animal de mania, validando mais uma vez este modelo de indução de hiperlocomoção pela AMPH.

Entretanto, considerando que os pacientes eutímicos apresentaram níveis de NT-3 semelhantes aos controles, e que estes pacientes estavam em uso de

fármacos estabilizadores de humor, Li e VPT, os níveis elevados observados tanto em deprimidos como maníacos minimizam a suspeita de que os resultados observados sejam decorrentes do tratamento farmacológico.

Embora os resultados observados tenham uma plausibilidade biológica tanto através de modelos experimentais com estudos de genética e anatomopatológicos em seres humanos e considerando tratar-se de um estudo de associação, relação de causa e efeito não pode ser estabelecida de forma inequívoca. Neste sentido, é mais prudente considerarmos que níveis séricos elevados de NT-3 estão associados tanto a sintomas depressivos como maníacos em pacientes com THB, podendo ou não existir uma relação de causa e efeito nesta associação. A possibilidade de utilizar-se clinicamente o NT-3 como um indicativo de sintomatologia depressiva ou maníaca ou até como marcador precoce de descompensação destes sintomas é um ponto que também possa ser considerado clinicamente.

No nosso estudo do modelo animal de mania foi encontrado um aumento dos níveis de NT-3 induzidos pela AMPH, nos modelos de prevenção e reversão, tanto no sangue como no HIPO. Esta resposta foi distintamente alterada pelo uso de Li e VPT tanto antes do uso de AMPH (tratamento de prevenção), como após o uso de AMPH (tratamento de reversão). Li induziu um aumento de NT-3 em todas as condições. O VPT induziu um aumento de NT-3 somente no HIPO no tratamento preventivo. Lítio e Valproato modulam níveis séricos de NT-3 de forma diferente na presença de Anfetamina.

No presente estudo, demonstramos que tanto Li e VPT modulam níveis de NT-3 sérico e central (HIPO), embora os níveis sanguíneos e hipocampal não se correlacionem. Este dado já antecipa críticas ao primeiro experimento em humanos, pois os níveis periféricos de NT-3 não parecem refletir os níveis cerebrais. Esta falta de correlação, entretanto, não invalida os dados do primeiro estudo, pois fenômenos iniciados na periferia podem modular uma gama de fenômenos mediados centralmente, como a consolidação da memória.

No caso específico do VPT, que apresentou alterações maiores nos níveis de NT-3, a explicação pode ser vista por sua ação de indução do aumento do número de neurônios e sua indução na diferenciação do fenótipo GABAérgico conforme descrito por Laeng et al (2004). Como mostrado anteriormente, o córtex pré-frontal e o HIPO de pacientes bipolares contêm menos neurônios, o que pode estar refletindo a perda ou atrofia de neurônios gabaérgicos. (Knable 1999; Beasley et al, 2002; Laeng et al, 2004).

Estudos recentes sugerem que níveis de fatores neurotróficos oscilam de uma forma orquestrada durante o curso de um episódio agudo de humor e durante a eutímia. Por exemplo, BDNF sérico está reduzido na depressão bipolar e na mania (Cunha et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2006), enquanto GDNF sérico está aumentado durante a mania e a depressão bipolar (Rosa et al., 2006). É digno de nota que os fatores neurotróficos pareçam estar alterados apenas durante o curso dos estados de humor agudos, enquanto pacientes estabilizados

(eutímicos) apresentam fatores neurotróficos nos mesmos níveis que os controles (Cunha et al., 2006; Rosa et al., 2006). Tem sido descrito que o NT-3 é temporariamente e espacialmente expresso no lugar do BDNF em algumas populações neuronais, para compensar a perda do BDNF (Agerman and Enrfors, 2003). Estes efeitos compensatórios entre NT-3 e BDNF foram demonstrados pelo fato de que o papel crítico destas neurotrofinas na sobrevivência das células granulares cerebelares e hipocampais são revelados somente quando a sinalização de ambas as neurotrofinas está embotada (Minichiello and Klein, 1996). Além disto, a infusão de NT-3 aumenta a expressão do RNAm do BDNF no córtex cerebral (Schutte et al., 2000), e produz efeitos “tipo BDNF” induzindo a fosforilação do TrkB cortical (Rosa et al., 2006). Logo, estamos tentados a especular que o incremento nos níveis de NT-3 observados neste estudo ocorrem simultaneamente com a diminuição de níveis séricos de BDNF descritos previamente (Cunha et al., 2006). Este aumento pode agir como uma resposta fisiológica compensatória à tensão provocada pelos episódios de humor.

Muitos dos processos relacionando pontos em comum entre NT-3 e estabilizadores de humor, em especial o VPT e Li, descritos acima se referem a eventos fisiológicos ocorridos durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Sabe-se que vias de sinalização bioquímicas, particularmente relacionadas a processos do desenvolvimento e maturação do sistema nervoso, possam ser reativadas em condições patológicas. No que diz respeito ao uso de VPT e Li no THB, não há dados na literatura que permitam afirmar, além de serem muito restritos, que o efeito terapêutico destes fármacos esteja relacionado à modulação



de eventos tipicamente ocorridos no desenvolvimento reativados por ocasião da instalação da doença. Por outro lado, dependendo da região cerebral, sabe-se que neurônios maduros são fortemente influenciados pelas neurotrofinas, incluindo o NT-3. Assim, as variações nos níveis de NT-3 (e outras neurotrofinas) observadas em diferentes momentos do THB participam como causa direta do THB, ou são secundárias às modificações ocorridas na rede bioquímica celular decorrentes, por exemplo, das intervenções terapêuticas e gravidade da doença, são pontos importantes a serem esclarecidos. Tais hipóteses podem ser investigadas, ao menos em parte, através de modelos experimentais em ambiente controlado, embora com as sabidas limitações inerentes ao uso de animais para extrapolar as conclusões sobre patologias humanas.

Por fim, somente com a manipulação das neurotrofinas poderemos entender como os receptores são ativados e o contexto celular em que isto ocorre, bem como a ação decorrente desta ativação (Kalb, 2005).