

FABIO TRIACHINI CODAGNONE

**PAPEL DOS CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTES NO EFEITO
ANTIDEPRESSIVO DA LAMOTRIGINA.**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de mestre em
Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

**CURITIBA
2007**

*Dedico a minha esposa Josemari,
a Sofia amada filha e a
meus pais.*

*Se o conhecimento pode gerar problemas,
não é por meio da ignorância que poderemos resolvê-los.*

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste período tive a colaboração e apoio de inúmeras pessoas, algumas destas pessoas foram mais presentes, outras um pouco mais distantes, porém não menos importantes.

Agradeço em especial a minha família por todo amor, carinho e dedicação que me ofertou, permitindo com que eu não hesitasse nos momentos difíceis.

Agradeço a minha esposa Josemari pelo seu estímulo, sua paciência, seu amor, dedicação e carinho para comigo e para com nossa filha Sofia.

Agradeço ao meu pai de quem herdei seu espírito crítico, e a minha mãe de quem herdei seu espírito prático.

Agradeço ao meu orientador Prof.Dr. Roberto Andreatini por compartilhar sua sabedoria e estimular o meu crescimento profissional e pessoal, e por ser exemplo de que é possível conquistar o conhecimento sem se tornar arrogante, ter autoridade sem ser autoritário e ser duro sem perder a sensibilidade.

A Farmacêutica Silvia Nardi Cordazzo Genari pela sua ajuda no preparo das soluções e pelo seu profissionalismo e carinho dedicados a todos deste departamento.

A todos os docentes e funcionários do departamento de Farmacologia.

Aos funcionários do biotério do Setor de Ciência Biológicas da UFPR.

Aos amigos do Mestrado e Doutorado.

Ao Prof.Dr.Herbert Arlindo Trebien pelos seus conselhos (a maioria carregados de humor).

Ao amigo Fernando Consoni por sua colaboração inestimável na análise dos experimentos.

Ao pessoal do futebol de “quarta-feira”, em especial ao Prof. Dr Paulo Roberto Dalsenter.

Aos amigos do Laboratório Municipal de Curitiba, em especial aos dos setores de Imunologia e Urinálises.

À Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba que me concedeu a licença para que pudesse concluir o mestrado.

A todos o meu muito obrigado!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO.....	6
2.1 Glutamato e Depressão.....	6
2.2 Lamotrigina e seus Efeitos em Estudos Pré-Clínicos.....	12
2.3 Lamotrigina e outros modelos comportamentais.....	17
2.4 Canais de Sódio – Aspectos Moleculares.....	19
2.5. Neurotoxinas Como Ferramentas Para o Estudo Funcional dos Canais de Sódio.....	22
2.6 Teste de Natação Forçada Modificado.....	23
3 OBJETIVO.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5 PROCEDIMENTOS.....	28
5.1 Teste de Natação Forçada Modificado.....	28
5.2 Teste do Campo Aberto.....	28
5.3. Análise Estatística.....	29
6 HIPÓTESE.....	29
7 RESULTADOS.....	31
7.1. Teste de Natação Forçada Modificado.....	31
7.2. Campo Aberto.....	36
8 DISCUSSÃO GERAL.....	40
9 CONCLUSÕES.....	48
10 BIBLIOGRAFIA.....	50

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	7
FIGURA 2 – PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO DA LAMOTRIGINA SOBRE A CASCATA DE EVENTOS INDUZIDAS PELA VERATRINA.....	17
FIGURA 3 – ESTRUTURA DA SUBUNIDADE α DO CANAL DE SÓDIO.....	21
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO.....	25
FIGURA 5 - POSSÍVEIS EVENTOS RELACIONADOS A AÇÃO DA LAMOTRIGINA NA DEPRESSÃO.....	30
TABELA 1 – PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO DA LAMOTRIGINA, OUTRAS DROGAS ANTICONVULSIVANTES E DO LÍTIO	6
TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DO TNF MODIFICADO.....	40

RESUMO

A lamotrigina é uma droga anticonvulsivante, de amplo espectro, que teve seu uso estendido à psiquiatria. Estudos randomizados, duplo-cegos controlados, com a lamotrigina evidenciam sua eficácia antidepressiva na depressão bipolar, depressão bipolar com ciclagem rápida e transtornos de humor refratários a outros tratamentos. Entretanto, o mecanismo de ação antidepressiva da lamotrigina permanece incerto. A lamotrigina é estruturalmente diferente dos anticonvulsivantes atuais, e acredita-se que sua ação anticonvulsivante decorra da inibição da liberação de glutamato decorrente do bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes. No presente estudo foi avaliado o papel dos canais de sódio voltagem-dependentes e da via L-arginina/NO sobre o efeito antidepressivo da lamotrigina no teste de natação forçada modificado (TNF). A veratrina, uma droga ativadora dos canais de sódio, a L-arginina, um substrato da NOS e o nitroprussiato de sódio, um doador de NO, foram utilizados na abordagem farmacológica. Dizolcipina (MK 801), um antagonista não competitivo do receptor NMDA, e nortriptilina, um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina, foram utilizados como padrão para drogas antiglutamatérgicas e como drogas que aumentam o comportamento de escalada no TNF modificado, respectivamente. Carbamazepina foi empregada para estabelecer um padrão para drogas bloqueadoras dos canais de sódio voltagem-dependentes no TNF.

A administração prévia da veratrina reverteu o efeito anti-imobilidade da lamotrigina, bem como o aumento do comportamento de natação; por outro lado o aumento do comportamento de escalada induzido pela lamotrigina foi mantido.

Enquanto a administração de L-arginina não foi capaz de reverter o efeito anti-imobilidade da lamotrigina, o mesmo não ocorreu com a administração de nitroprussiato que foi útil na reversão do efeito antidepressivo da lamotrigina.

Os resultados sugerem que somente o efeito serotoninérgico da lamotrigina está associado a sua capacidade de bloquear os canais de sódio voltagem dependentes. Já o aumento da neurotransmissão noradrenérgica eliciada pela lamotrigina parece ser independente do bloqueio dos canais de sódio.

Desde que o nitroprussiato alterou o efeito anti-imobilidade da lamotrigina estes resultados, também, sugerem que o efeito antidepressivo da lamotrigina é dependente, em parte, da inibição da síntese liberação de óxido nítrico.

Palavras-chave: Lamotrigina, depressão bipolar, teste de natação forçada, glutamato, óxido nítrico, canal de sódio, antidepressivo.

ABSTRACT

The Lamotrigine (LTG) is a broad spectrum antiseizure drug that has also been used in psychiatry. The randomized double-blind, placebo controlled studies with lamotrigine indicate a clinical antidepressant effect in bipolar depression, rapid cycling bipolar depression and treatment-resistant mood disorders. However, the mechanism of antidepressant action of lamotrigine is still unclear. LTG is structurally unrelated to the existing antiepileptic drugs, and its anticonvulsant action has been suggested to be due to the inhibition of Glutamate (Glu) release by a blockade of voltage-sensitive sodium channels. In present report we evaluate the role of voltage-dependent sodium channels and nitric oxide in antidepressant-like effect of lamotrigine in modified forced swimming test (FST). The veratrine, an activator of sodium channel drug, L-arginine, a substrate of NOS, and sodium nitroprusside, a NO donor, were utilized at pharmacological approach. Dizolcipine, an uncompetitive NMDA receptor antagonist, and nortriptyline, a selective noradrenergic reuptake inhibitor antidepressant, were utilized such as gold standard for antiglutamatergic drugs and drugs that increased climbing behavior in forced swim test, respectively. Carbamazepine was employed to establish a pattern in the modified forced swimming test for sodium channels block drugs.

The pre-treatment with veratrine reverses the anti-immobility effect of lamotrigine through a blockade of increase swimming, a serotonergic related behavior. On the other hand, climbing was not changed by veratrine pre-treatment.

The pre-treatment with L-arginine did not change the anti-immobility effect of lamotrigine, although nitroprusside was able to block the antidepressant-like effect of lamotrigine.

These results suggest that only the serotonergic effect of lamotrigine is associated to its capacity to block Na^+ - voltage sensitive channel. Otherwise, the noradrenergic action of lamotrigine appears to be independent of block Na^+ - voltage sensitive channel.

Since nitroprusside changed anti-immobility effect of lamotrigine these results also suggest that the antidepressant-like effect of lamotrigine is dependent, in part, of the inhibition of NO synthesis/release.

Key-words: Lamotrigine, bipolar depression, forced swim test, glutamate, nitric oxide, sodium channel, antidepressant.

1. INTRODUÇÃO

A depressão é um grave problema na sociedade atual com prevalência aproximada em 21% na população de alguns países desenvolvidos. É definida pela Associação Americana de Psiquiatria como um distúrbio heterogêneo, frequentemente manifestado por sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos (Nestler et al., 2002).

O distúrbio bipolar, que se caracteriza por flutuações de humor (depressão e mania ou hipomania), é uma das mais comuns, graves e devastadoras doenças psiquiátricas, estando associada com decréscimo na qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares. A depressão é uma séria preocupação em pacientes com distúrbio bipolar de humor. O manejo do transtorno bipolar tem, historicamente, focado o tratamento da mania, enquanto o tratamento da depressão bipolar tem sido, relativamente, negligenciado (Herman, 2004). Entretanto, muitos destes pacientes experimentam sintomas depressivos mais frequentemente do que sintomas maníacos ou hipomaníacos. Pacientes com distúrbio bipolar I ou bipolar II passam, substancialmente, mais tempo com sintomas depressivos do que com sintomas maníacos ou hipomaníacos (Bowden, 2005). Surge, portanto, a necessidade de se desenvolver drogas mais eficazes no tratamento da depressão e na diminuição de suas recidivas.

Com o surgimento da hipótese monoaminérgica, um grande avanço ocorreu na compreensão da neurobiologia da depressão. Segundo esta, a depressão decorreria da diminuição da neurotransmissão noradrenérgica. Posteriormente descobriu-se que não somente o déficit funcional de um único neurotransmissor e sim vários (serotonina, noradrenalina, dopamina) estavam envolvidos no processo (Hirschfeld, 2000).

Atualmente, são utilizadas clinicamente as seguintes classes de antidepressivos: inibidores não seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (amitriptilina, imipramina, venlafaxina, duloxetina), inibidores seletivos da recaptação de serotonina – ISRS- (fluoxetina, paroxetina, sertralina, clomipramina), inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (reboxetina), inibidores da monoaminoxidase -IMAO- (ex:

maclobemida) e Atípicos (p.ex: antagonistas alfa-2 – mirtazapina; antagonistas 5HT₂-Trazodona-). Excetuando-se alguns antidepressivos atípicos (p.ex. tianeptina), os demais antidepressivos atuam, de diferentes formas, aumentando a neurotransmissão monoaminérgica, efeito este considerado fundamental para atividade antidepressiva destes fármacos (Lucki e O'leary, 2004).

Acredita-se que este aumento das monoaminas nas sinapses induz, a longo prazo, alterações adaptativas no sistema monoaminérgico resultando em dessensibilização de auto e heteroreceptores inibitórios, incluindo os receptores pré-sinápticos α_2 , 5HT_{1b} e somatodendrítico 5HT_{1a} localizados em algumas regiões cerebrais (Elhwuegi, 2004). A dessensibilização desses receptores inibitórios pode levar a um aumento da atividade monoaminérgica central que coincide com a resposta terapêutica.

Entre os antidepressivos inibidores da recaptção de serotonina e/ou noradrenalina, temos os antidepressivos tricíclicos (ex.imipramina), que têm uma ampla gama de efeitos colaterais, incluindo constipação, diaforese, xerostomia, sedação, ganho de peso, bem como efeitos com potencial risco de vida, no ritmo cardíaco e na pressão arterial. Esses efeitos colaterais, decorrem da alta afinidade desses compostos a α_1 -adrenorreceptores, receptores histaminérgicos, muscarínicos e bloqueio de canais de sódio e acarretando baixa adesão ao tratamento e podendo ser perigosos em caso de superdosagem acidental ou intencional (Cryan et al., 2002) .

A baixa tolerabilidade dos antidepressivos tricíclicos estimulou a pesquisa de moléculas com maior especificidade neurofarmacológica que pudessem ser desenvolvidos como antidepressivos mais seguros. Nos anos 80 surgiram os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (fluoxetina, paroxetina, sertralina, etc). A experiência clínica com esses fármacos demonstrou que eles são eficazes na depressão e em diversos transtornos de ansiedade. Eles são desprovidos dos efeitos colaterais típicos dos antidepressivos tricíclicos, embora tenham efeitos colaterais específicos, particularmente náusea e outros sintomas gastrointestinais, bem como interferência na função sexual. Tem sido sugerido que esses medicamentos podem ser menos eficazes do que os antidepressivos tricíclicos, especialmente em pacientes com depressão mais grave.

Embora os antidepressivos sejam comumente usados no tratamento agudo da depressão bipolar, eles apresentam uma propensão em desestabilizar o humor induzindo mania ou ciclagem rápida quando usados por longos períodos (Herman, 2004). Neste caso, surge a necessidade da descoberta de novos alvos farmacológicos e, conseqüentemente, novas drogas antidepressivas que associem tratamento eficaz com segurança a longo prazo.

O interesse por novos compostos antidepressivos também se faz necessário devido a latência farmacológica para o efeito clínico (3 a 4 semanas para os antidepressivos utilizados atualmente), o que pode limitar o seu uso em situações agudas. Independente da estrutura química, propriedades farmacocinéticas e alvos celulares ou moleculares no cérebro, todos os antidepressivos necessitam ser administrados por algumas semanas para produzir uma significativa melhora clínica, isto é, redução de 50% na gravidade (Adell et al., 2005). Assim, neste cenário, vários autores têm relatado que alguns compostos glutamatérgicos poderiam ter utilidade em intervenções imediatas sendo, possivelmente, desprovidos de efeitos sedativos (Carobrez, 2003).

Alguns estudos (pré-clínicos e clínicos) têm demonstrado um efeito antidepressivo das drogas anticonvulsivantes como Carbamazepina (Barros e Leite, 1987), Oxcarbamazepina (Herman, 2004; Bowden, 2005; Joca et al., 2000) e Lamotrigina (Herman, 2004; Bowden, 2005; Calabrese et al., 2005). Esta última tem sido usada como anticonvulsivante há anos e foi aprovada para o tratamento de manutenção no distúrbio bipolar I em 2003.

Recentes estudos, utilizando modelos animais de depressão, indicam que o efeito antidepressivo da lamotrigina está provavelmente relacionado a uma ação noradrenérgica/serotoninérgica, embora os mecanismos permaneçam obscuros (Bourin et al., 2005; Consoni et al., 2006; Kaster et al., in press). Estudos preliminares da lamotrigina indicam que sua ação, nos distúrbios de humor, poderia ocorrer por intermédio de um efeito anti-glutamatérgico, o que resultaria numa diminuição da liberação de NO com conseqüente aumento de serotonina. Estudos têm evidenciado uma interação entre os sistemas glutamatérgico, NO e sistema monoaminérgico, o que sugere que manipulações sobre estes diferentes sistemas podem resultar num efeito

antidepressivo (Paul e Skolnick, 2003). Enquanto as monoaminas estão diretamente relacionadas à efetividade clínica das drogas antidepressivas, há dados pré-clínicos indicando que os inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) também exerçam um efeito antidepressivo (Harkin et al., 2003; Joca e Guimarães, 2006). Além disso, há evidências de que o efeito antidepressivo dos inibidores da NOS é mediado por mecanismos serotoninérgicos.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e medeia e regula importantes processos como plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Nestler et al., 2002; Paul e Skolnick, 2003; Nascimento et al., 2006). Em decorrência de seu papel na plasticidade sináptica e sua ampla distribuição cerebral, a modulação do sistema glutamatérgico tem sido investigada em diversos estudos clínicos de transtornos psiquiátricos, marcadamente em quadros que se caracterizam por piora do humor, aprendizado, atenção e memória.

O uso de antagonistas alostéricos dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato), em estudos pré-clínicos, evidenciam que estes agentes apresentam propriedades antidepressivas. O tratamento crônico com antagonistas NMDA resulta em efeitos antidepressivos em modelos animais como estresse crônico, desamparo aprendido, agressão induzida por choque, e bulbectomia olfatória. Tratamento crônico, mas não agudo, com antagonistas NMDA, também reduz a densidade de β -adrenorreceptores e receptores serotoninérgicos 5HT₂ cerebrais (Mathew et al., 2005). Parte das evidências clínicas de que a modulação da atividade glutamatérgica pode ser importante no tratamento dos transtornos de humor provém da utilidade clínica do anticonvulsivante Lamotrigina. Embora a lamotrigina apresente efeitos celulares múltiplos, incluindo inibição (bloqueio) de canais de sódio e cálcio (tipo N e P), a inibição da liberação excessiva de glutamato parece ser um importante aspecto do seu mecanismo de ação (tabela 1).

Até a aprovação do uso da lamotrigina no tratamento da depressão bipolar, a única droga comprovadamente efetiva neste transtorno era o lítio. O mecanismo de ação do lítio permanece obscuro, mas acredita-se que o uso crônico diminui a ativação da

adenilato ciclase (AC) e esta ação pode ser revertida pelo aumento da concentração de guanosina trifosfato (GTP), sugerindo que os efeitos do tratamento com o lítio podem ser mediados no nível das proteínas G. No entanto, em estado basal o lítio aumenta a formação de AMPc no cérebro de ratos. Dessa forma, tem-se sugerido que a ação do lítio na atividade da AC é estado dependente: em condições basais aumenta a formação do AMPc e no estado ativado (quando da ativação da AC pelo conjunto receptor/Gs) a formação do AMPc é atenuada. Esse mecanismo de ação “bimodal” poderia ser uma das explicações do efeito terapêutico do lítio tanto na depressão quanto na mania (Frey et al., 2004).

O lítio ainda interfere no metabolismo do inositol trifosfato, responsável pela liberação do cálcio de seus depósitos intracelulares, possivelmente através da inibição de enzimas na rota de formação do inositol 2,3.

A inibição do inositol-1-fosfatase leva a uma depleção relativa de inositol e, conseqüentemente, a alterações no receptor acoplado ao fosfatidilinositol; porém, os efeitos da administração crônica são provavelmente mediados por mudanças distais ao receptor (por exemplo, em nível de proteína G) ou modificações nas isoenzimas da proteína quinase-C, que acarretariam em fosforilações de proteínas nucleares (Machado-Vieira et al, 2003).

TABELA 1 – PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO DA LAMOTRIGINA E OUTRAS DROGAS ANTICONVULSIVANTES E DO LÍTIO

Ações	LTG	CBZ	VPA	Li
Bloqueio canal de sódio	+++	+++	++	—
Antiglutamatérgica	++	++	++	+
Gabaérgica	±	±	+++	±
Monoaminérgica	±	+	+	++

+++ , grande; ++, moderado; +, pouco; ± ,fraco; -, ausente.

LTG- lamotrigina, CBZ- carbamazepina, VPA- ácido valpróico, Li- lítio.

Tabela Adaptada de KETTER, T.A *et al.*,2003.

2. REVISÃO DA LITERATURA

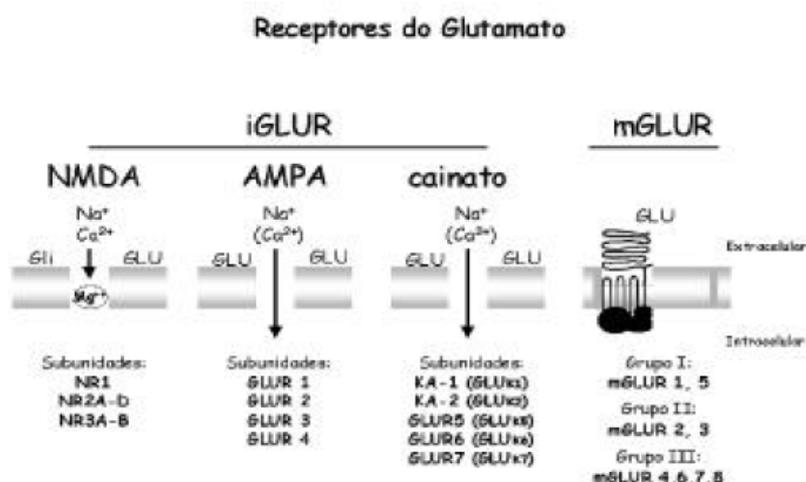
2.1.Glutamato e Depressão

As ações excitatórias do Glutamato (GLU) são conhecidas desde os anos 50. É sabido que neurônios que empregam aminoácidos excitatórios (AE) como neurotransmissor correspondem a aproximadamente 30% dos neurônios cerebrais e estes neurônio são amplamente distribuídos no SNC. Alta densidade de neurônios “reativos” a glutamato é encontrada no córtex. Ainda, neurônios contendo glutamato são encontrados em estruturas subcorticais, como hipocampo, núcleo caudato, núcleo talâmico e cerebelo (Paul e Skolnick, 2003).

Conforme ilustrado na figura 1, os receptores glutamatérgicos podem ser classificados genericamente como ionotrópicos (iGLU: ligados a um canal iônico) e metabotrópicos (mGLU: ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal,

via proteína G). O glutamato exerce sua função através de 3 classes de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, incluindo AMPA (GluR1-4), NMDA (NR1, NR2A-D, NR3A-B) e Kainato (KA, GluR5-7, KA1-2) e 3 classes de receptores metabotrópicos: grupo I (mGlu₁ e mGlu₅), grupo II (mGlu₂ e mGlu₃) e grupo III (mGlu₄, mGlu₇ e mGlu₈) (Swanson et al., 2005). Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos são canais iônicos que promovem o influxo e efluxo de sódio, potássio e cálcio da célula sob estímulo do glutamato. A abertura do poro e subsequente influxo de íons leva a mudanças na polarização da membrana (potencial de membrana) bem como uma ativação direta de vias de sinalização intracelular (Du et al., 2006).

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS



NOTA: Figura extraída da publicação de CAROBREZ, A.P., 2003.

Experimentos realizados ao longo dos últimos anos têm comprovado o envolvimento do GLU no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória, no dano neuronal pós-isquemia ou hipoglicemia, na epilepsia e outras doenças neurodegenerativas, na dependência e tolerância a drogas, na dor neuropática, na ansiedade e na depressão (Carobrez, 2003).

Grande ênfase tem-se dado à participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos em transtornos psiquiátricos, a saber: esquizofrenia, depressão e transtorno bipolar.

Recentes teorias patofisiológicas a respeito da neurobiologia dos transtornos de humor, incluindo a depressão e o transtorno bipolar, propõem alterações na cascata de sinalização intracelular e prejuízo na plasticidade sináptica, o que resultaria na diminuição do número de células neuronais e gliais tanto no hipocampo (Kempermann e Kronenberg, 2003; Frey et al., 2004), quanto no córtex pré-frontal (Frey et al., 2004). Há evidências sugerindo que moléculas críticas na cascata de sinalização neurotrófica como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), um membro da família dos fatores de crescimento “neural”, responsável pelo aumento do reforço sináptico, sobrevivência e crescimento de neurônios maduros (Coyle e Duman, 2003), e proteínas quinase com atividade mitogênica (MAP quinase) são alvos a longo prazo dos atuais antidepressivos (Zarate Jr et al., 2005).

Estudos sugerem que alterações nos “níveis” de BDNF podem, em parte, mediar o dano estrutural e reduzir a neurogênese hipocampal após eventos estressantes e estas modificações são prevenidas com o uso dos antidepressivos.

Além disso, em estudos *post mortem* níveis reduzidos de BDNF têm sido observados no hipocampo de pacientes deprimidos e esta anormalidade não tem sido encontrada em pacientes tratados com antidepressivos (Berton e Nestler, 2006).

A proliferação de células no hipocampo adulto se encontra diminuída com a administração de NMDA e aumentada após a administração de antagonistas do receptor NMDA (dizolcipina -MK-801 e CGP 434887). Além disso, a lesão no córtex entorrinal, o qual provém o maior “input” de neurônios glutamatérgicos para o hipocampo, aumenta a proliferação celular nesta região (Mckowiak et al., 2004). Novos dados indicam uma modulação por parte de receptores glutamatérgicos específicos, atuando como componentes essenciais no mecanismo de ação dos antidepressivos convencionais (Nowak e cols, 1996; Mathew e cols, 2005). O tratamento crônico com alguns antidepressivos (citalopram, por exemplo) diminui o número de receptores NMDA ou

reduzem a liberação de glutamato através de mecanismos pré-sinápticos. Recentes estudos indicam a deleção de uma subunidade do receptor NMDA levando a um perfil ansiolítico e antidepressivo (Berton e Nestler, 2006).

Pacientes com transtorno bipolar de humor apresentam alterações na captação de glutamato pelas plaquetas. As plaquetas expressam receptores glutamatérgicos na superfície de suas membranas, cuja função é antiagregante, e transportadores de glutamato, cuja função é análoga àqueles encontrados no encefálo. Os níveis de captação plaquetária de glutamato radioativo (^3H) estão aumentados em pacientes que se encontravam em episódio maníaco quando comparados aos pacientes sob tratamento de Lítio e ao grupo controle (Nascimento et al., 2006).

A ativação sustentada do receptor NMDA sinaliza para enzimas responsáveis pela fosforilação da proteína CREB (elemento responsivo de ligação ao AMPc), ativação múltipla de genes e plasticidade sináptica a longo prazo. Entretanto, o excesso de glutamato leva a superestimulação dos receptores NMDA levando a um aumento do influxo de cálcio e consequente ativação de enzimas Ca^{++} dependentes, como a óxido nítrico sintase, resultando no processo de excitotoxicidade (Harkin et al., 1999; Kemp e McKernan, 2002).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que alguns antidepressivos se ligam a receptores NMDA e inibem a ligação dos receptores NMDA a seus ligantes. De forma similar, vários laboratórios têm reportado que diversos antidepressivos podem modular a liberação e/ou recaptção de glutamato (Paul e Skolnick, 2003). Ainda, estudos pré-clínicos sugerem que a redução da função dos receptores NMDA resulta num efeito antidepressivo em diferentes modelos animais e previnem as alterações morfológicas de neurônios hipocâmpais induzidas por estresse (Berton e Nestler, 2006).

Evidências da participação do glutamato no processo depressivo provêm, também, de estudos clínicos com a Ketamina, um antagonista alostérico não competitivo dos receptores NMDA. Em um estudo realizado com nove pacientes com depressão, a administração de uma única dose intravenosa de ketamina (0,5 mg/Kg , infundido durante

40 minutos) promoveu uma redução significativa dos sintomas avaliados pela escala de Hamilton (Mathew et al., 2005).

A participação dos receptores AMPA glutamatérgicos também tem sido evidenciada como demonstrado no trabalho realizado por Du et al. (2006 a,b). Neste trabalho foram acrescentados lamotrigina (20 μ M), riluzole (2.0 μ M) e valproato (1.0 μ M) a uma cultura de neurônios de ratos e posteriormente as subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA foram analisadas por ensaio de biotinylação seguido por Western Blot. Os resultados demonstraram que tanto a lamotrigina quanto o riluzole aumentaram a expressão das subunidades GluR1 e GluR2, enquanto o tratamento com valproato as diminuíram. Isso sugere que agentes com “perfil antidepressivo” predominante (lamotrigina e riluzole) significativamente aumentam a expressão de GluR1 e GluR2. Em contrapartida, o agente antimaníaco valproato promove uma redução na expressão de GluR1 e GluR2. Ainda, em modelos animais de depressão, como o teste de natação forçada e teste de suspensão da cauda, diversas drogas “potenciadoras” dos receptores AMPA (potenciadores são moduladores alostéricos positivos, ou seja, ligantes que aumentam a atividade do receptor), em especial LY392098, têm demonstrado uma eficácia semelhante aos antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina e aos tricíclicos (Alt et al., 2006).

Alguns dados confirmam a importância dos receptores AMPA no tratamento, e possivelmente na etiologia, dos transtornos de humor. Estas evidências são as seguintes: (1) os potenciadores dos receptores AMPA aumentam os níveis de BDNF em áreas relevantes do cérebro, (2) os potenciadores dos receptores AMPA aumentam a proliferação celular no hipocampo *in vivo*, (3) os potenciadores dos receptores AMPA são efetivos em modelos animais agudos e crônicos de atividade antidepressiva, (4) potenciadores dos receptores AMPA e antidepressivos convencionais demonstram um efeito sinérgico em modelos animais de depressão, (5) fluoxetina ativa os receptores AMPA. Tomando este conjunto de dados podemos verificar uma conexão dos receptores AMPA as duas principais “correntes” teóricas da depressão: monoaminas e molecular, BDNF (Alt et al., 2006).

O alvo farmacológico mais recente no “sistema” glutamatérgico é a família dos transportadores de aminoácidos excitatórios, os quais servem para remover o glutamato das sinapses. As concentrações extracelulares de glutamato estão aumentadas em diversas regiões do encéfalo após a exposição a fatores estressantes (Mineur et al., 2007). A expressão dos transportadores de glutamato está aumentada depois da exposição a fatores estressantes, possivelmente um efeito compensatório ao aumento da liberação de glutamato induzido pelo estresse (Mineur et al., 2007). Os transportadores do subtipo 1 e 2 em particular, que se localizam nos astrócitos, aparentam ter um papel na recaptação de glutamato e posteriormente sendo este convertido em glicina. Estudos animais mostram que estes transportadores são importantes para excitabilidade sináptica normal, enquanto sua disfunção está implicada em transtornos neurológicos agudos e crônicos como esclerose lateral amiotrófica, acidente vascular cerebral, tumores cerebrais e epilepsia (Rothstein et al., 2005). Recentes trabalhos têm encontrado que uma classe específica de antibióticos, os antibióticos β lactâmicos, aumenta a expressão gênica de subtipos de transportadores de aminoácidos excitatórios, que são importantes na prevenção da neurotoxicidade. Nesta linha, Mineur et al. (2007), verificaram um efeito antidepressivo da ceftriaxona, um antibiótico β -lactâmico, administrada durante 18 dias, em 2 modelos animais de depressão: modelo da natação forçada e do teste da suspensão da cauda; porém o tratamento falhou num terceiro modelo (teste de hipofagia). Isto sugere que o aumento da recaptação de glutamato pode ter um efeito antidepressivo, sugerindo que o mecanismo de captação de glutamato pode estar prejudicado nos Transtornos de Humor.

Uma das mais importantes funções do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é o seu envolvimento na resposta ao estresse (Jezova, 2005) sendo que a exposição a fatores estressantes tem um papel importante no desenvolvimento de transtornos de humor, principalmente a depressão (Joca et al., 2003). A excitação do eixo HPA pela administração central de glutamato foi demonstrada há 30 anos. O significado funcional do controle da secreção de ACTH (Hormônio adrenocorticotrófico) pelos aminoácidos excitatórios, como o glutamato, em situações de estresse têm sido objeto de estudos. Para isto tem-se utilizado antagonistas de receptores glutamatérgicos (Jezova, 2005).

A injeção periférica de um antagonista competitivo do receptor NMDA, o qual não atravessa a barreira hematoencefálica, falhou em modificar a resposta ao ACTH durante o estresse. Entretanto, o pré-tratamento com a dizolcipina (MK-801) – um antagonista não competitivo, de ação central, do receptor glutamatérgico do tipo NMDA - embora tenha aumentado as concentrações basais de ACTH, atenuou a resposta ao ACTH durante o estresse por imobilização (Jezova, 2005).

Concluindo, agentes terapêuticos dirigidos diretamente a estes diferentes alvos moleculares do glutamato podem resultar em efeitos complexos sobre uma ampla gama de sintomas neuropsiquiátricos.

2.2. Lamotrigina e seus efeitos em estudos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*)

A lamotrigina é um anticonvulsivante de amplo espectro que assim como outros anticonvulsivantes (carbamazepina, oxcarbamazepina, valproato, topiramato, etc) tem sido utilizada no tratamento de transtornos psiquiátricos. Seu uso principal na psiquiatria se dá no tratamento dos transtornos de humor, sendo indicada na terapia da fase depressiva do transtorno bipolar tipo I e II, e em casos de depressão refratárias a outros tratamentos. Sua indicação na psiquiatria provém de estudos clínicos que comprovam sua eficácia como agente antidepressivo e, além disso, a colocam como uma droga estabilizadora de humor (Calabrese et al., 1999 e 2000; Herman, 2004; Bowden, 2005).

Enquanto os mecanismos moleculares envolvidos no efeito anticonvulsivante da lamotrigina já estão bem estabelecidos o mesmo não acontece com seu efeito antidepressivo. Com o objetivo de elucidar tais mecanismos vários estudos têm sido conduzidos *in vivo* e *in vitro*. Southam et al. (2005) estudaram o efeito da lamotrigina sobre a atividade da monoaminoxidase (MAO) do tipo A e B e evidenciaram uma baixa seletividade pelas isoformas A e B *in vitro*. Ainda, *in vitro*, a lamotrigina promoveu uma inibição das isoenzimas em concentrações da droga semelhantes às aquelas encontradas no fluido espinhal e fluido extracelular cerebral. Esta inibição não foi confirmada em estudos

ex vivo (tecidos). Com intuito de determinar os efeitos da administração de lamotrigina sobre as concentrações de monoaminas foi empregada a técnica de microdiálise. Tanto no tratamento crônico (córtex frontal) quanto agudo (córtex frontal e hipocampo ventral) não foram observadas alterações significativas nas concentrações extracelulares de serotonina e dopamina. Além disso, a lamotrigina falhou na indução de hipertensão provocada pela administração de tiramina, um modelo animal de drogas com ação sobre a MAO-A. Uma possível explicação para ausência da inibição da atividade da MAO *in vivo* decorre da dificuldade da lamotrigina em alcançar o compartimento intracelular (onde está localizada a MAO), já o mesmo não ocorrendo com os canais de sódio que estão localizados na membrana.

Em outro estudo (Ahmad et al., 2005) foram verificados os níveis de diferentes aminoácidos e monoaminas (sob condições basais ou estimulado) no hipocampo de ratos em livre movimentação submetidos à microdiálise. Os animais foram submetidos ao tratamento com diferentes anticonvulsivantes (lamotrigina, carbamazepina e fenitoína), os quais apresentavam semelhança quanto ao mecanismo de ação (todos bloqueiam os canais de sódio voltagem-dependentes). Nenhuma droga apresentou efeito sob os níveis extracelulares basais dos aminoácidos estudados, com exceção da lamotrigina que, na sua maior dose, levou a uma diminuição dos níveis de glutamato. Já no caso do aumento dos níveis de aminoácidos estimulado pela veratrina (uma droga ativadora dos canais de sódio), a lamotrigina promoveu uma diminuição modesta (em torno de 50%) e dose-dependente nos níveis extracelulares de aspartato evocados. No caso do glutamato, uma profunda diminuição nos níveis extracelulares foi observada, chegando a níveis menores do que 20% em relação ao grupo controle. Tanto a carbamazepina quanto a fenitoína não alteraram os níveis de glutamato evocados por veratrina.

Os níveis basais de serotonina e dopamina foram significativamente diminuídos de forma dose-dependente pela lamotrigina e de forma oposta os níveis destas monoaminas se apresentaram aumentados com o uso de carbamazepina e fenitoína neste estudo (Ahmad et al., 2005).

Posteriormente, Ahmad et al.(2006), novamente através da técnica de microdiálise, estudaram o efeito da lamotrigina e valproato de sódio, isoladamente ou associados, sob os níveis de aminoácidos e monoaminas no hipocampo de ratos em movimento, tanto no estado basal quanto estimulado (por veratrina). Ambas as drogas não alteraram os níveis basais de aminoácidos quando administradas isoladamente, porém a associação lamotrigina/valproato reduziu significativamente os níveis basais de aspartato e glutamato, e aumentou os níveis basais de taurina. A lamotrigina não apresentou nenhum efeito sob os níveis basais de GABA, porém o mesmo não foi observado em relação a associação lamotrigina/valproato. Quando a liberação de neurotransmissores foi estimulada pela veratrina, a lamotrigina foi capaz de reduzir os níveis de todos os aminoácidos. Já o valproato alterou somente os níveis de GABA que se situaram ligeiramente acima dos níveis em condições basais. A administração de valproato associada à lamotrigina reverteu o decréscimo nos níveis de aminoácidos observados com o uso isolado de lamotrigina. Já em relação às monoaminas, os níveis basais de serotonina foram aumentados com o uso isolado de valproato e a lamotrigina, administrada isoladamente, levou a uma diminuição dos níveis basais de dopamina. A associação lamotrigina/valproato levou a um aumento prolongado nos níveis de serotonina em condição basal; já em relação a dopamina não houve alteração. Quando os níveis de monoaminas foram evocados por veratrina, os níveis de serotonina foram aumentados com o uso de valproato. Em relação a dopamina somente a associação lamotrigina/valproato resultou em aumento dos níveis evocados.

Estes estudos (Ahmad et al., 2005 e 2006) sugerem que embora o bloqueio dos canais de sódio seja compartilhado entre estes anticonvulsivantes, mecanismos moleculares subjacentes ocorrem fazendo com que se diferenciem na modulação dos sistemas glutamatérgico e monoaminérgico.

O efeito da lamotrigina sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, mais precisamente na liberação do hormônio corticotropina (CRH) foi avaliado por Tringali et al. (2006). Utilizando hipotálamos retirados de ratos, os pesquisadores avaliaram, *in vitro*, a ação da lamotrigina sobre a liberação de CRH bem como a expressão de RNA-m de

CRH. Os resultados demonstraram que tanto a liberação, quanto a expressão de CRH, no estado basal, foram diminuídas com a administração de lamotrigina em concentrações semelhantes a aquelas encontradas no fluido cérebro-espinhal de ratos (1 e 10 μM e em torno de duas vezes menores do que aquelas encontradas em seres humanos). Quando a liberação de CRH foi estimulada farmacologicamente através da veratridina e cloreto de potássio (KCl) a lamotrigina só se demonstrou eficaz em reverter os efeitos da veratridina, evidenciando que o bloqueio dos canais de sódio é importante para o seu efeito. Esta ação da lamotrigina neste estudo é interessante, visto que a depressão maior está associada com a hiperatividade de neurônios “codificadores” de CRH situados no núcleo paraventricular do hipotálamo, o aumento nas concentrações de CRH no fluido cérebro-espinhal, o prejuízo nas vias sinalizadoras do receptor de CRH, e redução no número de sítios de ligação ao CRH no córtex frontal (denominado de “dowregulation”) onde a expressão dos receptores é diminuída em virtude do aumento da liberação de CRH nesta região.

Utilizando o modelo de natação forçada modificado Consoni et al. (2006) observaram um efeito antidepressivo da lamotrigina, representado por uma diminuição do comportamento de imobilidade. Na dose de 20 mg/kg a lamotrigina apresentou um efeito dual, ou seja, aumento da natação mediado pelo aumento da neurotransmissão serotoninérgica e aumento da escalada mediado pelo aumento da neurotransmissão noradrenérgica/dopaminérgica, e na dose de 10 mg o efeito foi mediado pelo aumento da neurotransmissão noradrenérgica/dopaminérgica.

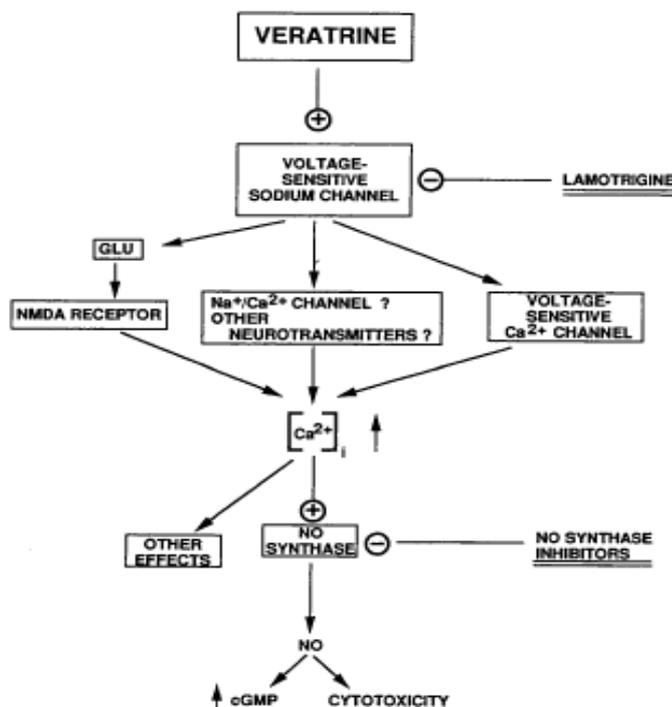
Anteriormente, também utilizando o modelo de natação forçada, Bourin et al. (2005) avaliaram o papel dos receptores 5HT-_{1A} na atividade antidepressiva da lamotrigina em camundongos. Para tanto utilizaram agonistas seletivos e não seletivos (8-OH-DPAT e RU 24969) e antagonistas seletivos e não seletivos (NAN-190 e pindolol) para o receptor 5HT-_{1A}. O tratamento com subdoses de 8-OH-DPAT e pindolol associadas a subdoses de lamotrigina resultaram numa diminuição no tempo de imobilidade o que condiz com o efeito antidepressivo. Isto sugere a participação dos receptores 5HT-_{1A} no efeito antidepressivo da lamotrigina. Uma vez que subdoses do

antagonista não específico 5HT_{-1A-B} pindolol associadas a subdoses de lamotrigina também resultou num efeito antidepressivo, o agonista 5HT_{-1B} amirtoline foi utilizado para avaliar o papel do receptor 5HT_{-1B} no efeito antidepressivo da lamotrigina. A associação de doses subativas de amirtoline/lamotrigina não reduziu a imobilidade no TNF. Os autores sugerem que mais estudos devam ser conduzidos para avaliar o papel dos receptores 5HT_{-1-B} neste efeito.

O envolvimento dos receptores 5HT_{1A} no efeito antidepressivo da lamotrigina é suportado no trabalho de Vinod e Subhash (2002) que, por meio de ensaios com radioligantes, observaram uma diminuição da densidade dos receptores 5HT_{1A} corticais de ratos submetidos ao tratamento crônico com lamotrigina, o mesmo não foi observado na região hipocampal.

É conhecido que no sistema nervoso central (SNC) o NO é o mediador responsável pelo aumento do GMP cíclico (GMPc) e isto se segue à estimulação dos receptores glutamatérgicos, principalmente os do tipo NMDA. É possível que não somente fisiologicamente, mas também em algumas condições patológicas ocorra o envolvimento das vias bioquímicas que levam a liberação de glutamato, com a consequente ativação da via L-arginina-NO. É provável que drogas que interferem em diferentes pontos desta via possam apresentar alguma ação terapêutica. Partindo deste pressuposto, Lizasoain e cols, avaliaram *in vitro* (utilizando fatias do córtex cerebral de ratos) se a liberação de glutamato estimulada pela veratrina ativa a via L-arginina-NO e, ainda, buscaram determinar se a lamotrigina, inibindo a liberação de glutamato estimulada pela veratrina, interfere com a estimulação da NO sintase. A despolarização causada com a veratrina levou a um aumento da liberação dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato, e um aumento concentração-dependente na síntese de NO e nos níveis de GMPc em “fatias” cerebrais de ratos. A lamotrigina inibiu a liberação de aminoácidos excitatórios estimulada pela veratrina, síntese de NO e consequente aumento de GMPc. Uma vez que a lamotrigina não se apresentou como um inibidor da NO sintase nas concentrações testadas neste estudo, pode-se concluir que a mesma promove uma inibição indireta da liberação de NO e, além disso, do aumento dos níveis de GMPc.

FIGURA 2 - PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO DA LAMOTRIGINA SOBRE A CASCATA DE EVENTOS INDUZIDAS PELA VERATRINA.



NOTA: Figura extraída da publicação de Lizasoain et al., 1995.

2.3 Lamotrigina e outros modelos comportamentais

A avaliação do efeito da lamotrigina na fase maníaca do transtorno bipolar foi realizada por Arban et al. (2005). Utilizando o modelo da D-anfetamina/clordiazepóxido, que mimetiza alguns aspectos da fase maníaca, os autores compararam a efetividade dos anticonvulsivantes lamotrigina, valproato e carbamazepina.

Todas as drogas foram efetivas na reversão da hiperatividade induzida pela associação D-anfetamina/clordiazepóxido. Na tentativa de estabelecer uma relação entre a eficácia anticonvulsivante com a eficácia anti-maniíaca das drogas foi utilizado o modelo

de convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Todas as drogas foram úteis em retardar o início das convulsões tônico-clônicas induzidas pelo pentilenotetrazol, embora o dobro da dose de valproato e carbamazepina tenha sido requerida para apresentar um efeito significativo no modelo de convulsão quando comparado ao modelo de mania. A lamotrigina pareceu ser equipotente nos dois modelos.

Um possível efeito ansiolítico da lamotrigina foi avaliado por Mirza et al. (2005), utilizando o modelo da resposta emocional condicionada (os animais são submetidos a pequenos choques e a diminuição da obtenção de comida após a apresentação de um estímulo condicionado -luz- é mensurada). Os pesquisadores avaliaram o efeito de diferentes drogas (valproato, carbamazepina, riluzole, paroxetina, propofol, memantina, diazepam, clordiazepóxido) neste modelo. A lamotrigina (30-80 mg/Kg) produziu um efeito ansiolítico dose-dependente e a magnitude deste efeito foi similar ao controle positivo clordiazepóxido. Carbamazepina (20-40 mg/Kg) e riluzole (10 mg/Kg), ambas as drogas bloqueadoras de canais de sódio voltagem-dependentes, também apresentaram um efeito ansiolítico. Por sua vez, o valproato (100-600 mg/kg) foi inativo. Paroxetina (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina), propofol (um modulador positivo do receptor GABA_A), memantina e MK-801 (antagonistas glutamatérgicos NMDA) foram todos inativos no modelo, sugerindo que estes mecanismos podem não mediar o efeito ansiolítico da lamotrigina. No intuito de acessar a possível participação dos canais de sódio, canais de cálcio e receptores 5HT_{1A} e 5HT_{1/2} no efeito ansiolítico da lamotrigina foram utilizados, respectivamente, veratrina (ativador de canais de sódio), BAYK8644 (agonista de canais de cálcio) e os antagonistas serotoninérgicos WAY100635 e metergolina. Somente a veratrina foi útil no bloqueio do efeito ansiolítico da lamotrigina, sugerindo que o bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes é importante para tal efeito.

Todos estes estudos reforçam a ação da lamotrigina sobre diferentes alvos farmacológicos (canais de sódio, glutamato, serotonina, noradrenalina/dopamina, óxido nítrico) e talvez, por isso, seu uso possa ser ampliado ao tratamento de outras doenças

psiquiátricas (Transtorno do estresse pós-traumático, por exemplo) além dos transtornos de humor.

2.4. Canais de sódio – aspectos moleculares

Estudos iniciais através de técnicas de “clampeamento” de voltagem demonstraram as 3 principais propriedades que caracterizam os canais de sódio: (1) ativação voltagem dependente, (2) rápida inativação e (3) condutância seletiva a íon. Estes estudos funcionais, conduzidos nas décadas de 60 e 70 do século passado, prediziam que os canais de sódio poderiam ser proteínas de membrana, difíceis de se isolar e de se identificar perante as diversas outras proteínas de membranas “excitadas”.

Durante a década de 70, novas linhas de pesquisa emergiram, focadas em métodos moleculares de análise dos canais de sódio: métodos bioquímicos para mensuração do fluxo de íons através dos canais de sódio, o uso de ligantes de alta afinidade (neurotoxinas) aos canais de sódio, e a solubilização e purificação de proteínas labéis dos canais de sódio por meio de neurotoxinas foram progressivamente desenvolvidas. Estas abordagens bioquímicas levaram à descoberta dos canais de sódio em 1980. Ensaio de fotoafinidade com um derivado fotoreativo de uma alfa-toxina encontrada no veneno de escorpião identificou a principal alfa subunidade (260 kDa) e uma subunidade β 1 auxiliar (36 kDa) de canais de sódio cerebrais (Beneski e Caterral, 1980).

Estudos subseqüentes demonstraram que o canal de sódio de cérebros de mamíferos é um complexo de alfa (260 kDa), β 1 (36 kDa), e β 2 (33 kDa) subunidades (Hartshorne e Caterral, 1981). Posteriormente, em meados da década de 80 e início da década de 90 com o avanço das técnicas de biologia molecular resultou numa melhor compreensão da estrutura e funcionamento dos canais de sódio.

Os canais de sódio consistem de um poro formado de uma α -subunidade (260 kDa) associada a unidades auxiliares: β 1 e β 2 e β 3. A α subunidade consiste de 4 domínios homólogos (I-IV), cada um apresentando 6 segmentos transmembranas (S1-S6),

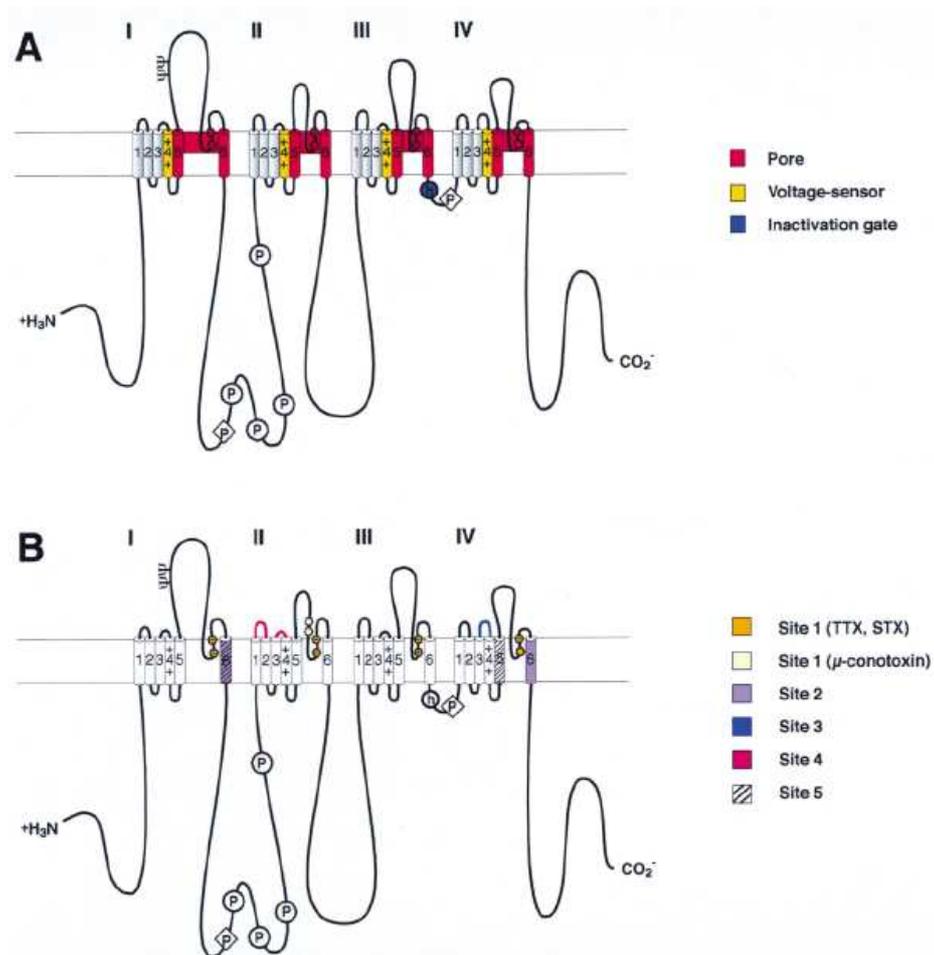
e um segmento reentrante (SS1-SS2) conectado por alças polipeptídicas internas e externas. Os segmentos S4 são positivamente carregados e servem como sensores de voltagem que iniciam a ativação dependente de voltagem do canal de sódio. A inativação é mediada por uma alça intracelular curta ligada aos domínios III e IV. A alça reentrante da membrana entre o segmento 5 (S5) e o segmento 6 (S6) (SS1-SS2) forma o “filtro” íon seletivo do poro (Cestèle e Caterral, 2000).

Os canais de sódio voltagem dependentes são bloqueados por anestésicos locais e anticonvulsivantes. O sítio de ligação aos anestésicos locais tem sido definido como o segmento transmembrana S6 do domínio IV (IVS6) da subunidade α , porém o anticonvulsivante lamotrigina e seus congêneres apresentam estruturas mais complexas do que os anestésicos locais e podem interagir com aminoácidos residuais adicionais (Liu et al., 2003).

A ligação de alta afinidade dos anestésicos locais ao estado inativado dos canais de sódio requer 2 resíduos de aminoácidos, Phe-1764 (fenilalanina) e Tyr-1771 (tirosina) nos canais tipo IIA cerebrais, os quais são localizados em algum lado do segmento transmembrana IVS4. Parece, ainda, que o grupo amino-terciário dos anestésicos locais interage com Phe-1764, o qual está localizado mais profundamente no poro, e o grupo aromático dos anestésicos locais interage com Tyr-1771, o qual está localizado perto do fim da cadeia intracelular do poro. Trabalhos de diversos laboratórios têm demonstrado que drogas de diferentes estruturas que bloqueiam os canais de sódio e que são utilizadas como antiarritmicas e anticonvulsivantes, também interagem com sítios semelhantes aos anestésicos locais, mas fazem interações adicionais com outros resíduos de aminoácidos vizinhos (Caterral, 2000).

As subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ dos canais de sódio apresentam estruturas similares, porém não são idênticas quanto a sequência de aminoácidos. Ambas as β -subunidades têm um largo domínio extracelular glicosilado, um segmento transmembrana simples e um pequeno domínio intracelular. Estudos evidenciam que a presença das subunidades β é necessária para uma cinética normal e voltagem dependência do canal (Caterral, 2000).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DA SUBUNIDADE α DO CANAL DE SÓDIO



NOTA: Figura extraída da publicação de Cestèle e Catterall, 2000.

Os canais de sódio voltagem-dependentes são alvos moleculares para drogas anticonvulsivantes incluindo a fenitoína, carbamazepina e a lamotrigina. Cada um destes componentes bloqueia os canais de sódio com marcante dependência de voltagem, tendo pouco efeito sobre canais em repouso, mas exibindo forte bloqueio quando os canais estão inativados por prolongada despolarização. Esta característica de bloqueio pode ser bem descrita pela hipótese da “modulação do receptor” na qual as drogas apresentam baixa afinidade pelo estado de repouso e uma grande afinidade pelo estado inativado.

Múltiplos compostos que são estruturalmente relacionados à lamotrigina têm sido sintetizados. Três destes componentes designados: 227c89, 4030w92 e 619c89 têm propriedades biológicas marcadamente diferentes. O composto 227c89 é um potente analgésico sem nenhuma propriedade anticonvulsivante. O componente 4030w92 é um analgésico, porém apresenta propriedades anticonvulsivantes e o componente 619c89 é utilizado na prevenção da toxicidade neuronal seguida do derrame. Apesar dessas diferenças na atividade farmacológica, todos são efetivos bloqueadores dos canais de sódio voltagem-dependentes.

A questão fundamental referente ao mecanismo de ação destas drogas é se elas agem num sítio comum dos canais de sódio e por conseguinte exercendo seus efeitos farmacológicos diversos ou se agem em sítios distintos dos canais de sódio ou outros alvos os quais levam a propriedades e a efeitos farmacológicos diferentes (Liu e cols, 2003).

Analogia pode ser feita ao uso dos anticonvulsivantes na psiquiatria. Tomando como exemplo o transtorno bipolar do humor, têm-se drogas que apresentam alta efetividade no controle das exacerbações maníacas, como o valproato e a carbamazepina, e drogas que apresentam alta efetividade no controle das exacerbações depressivas como a lamotrigina (Calabrese et al., 1999; 2000; 2003; 2005), e todas apresentam como propriedade comum o bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes.

2.5. Neurotoxinas como ferramentas para o estudo funcional dos canais de sódio

Os canais de sódio são alvos moleculares para diversos grupos de neurotoxinas, as quais alteram fortemente a função do canal através da ligação a sítios específicos. Seis diferentes sítios têm sido identificados nos canais de sódio, usando diferentes neurotoxinas. Estes diferentes sítios os quais as neurotoxinas alteram o funcionamento do canal, são alostericamente “acoplados”, sugerindo que as mudanças conformacionais induzidas pela ligação da neurotoxina altera o equilíbrio entre o estado de abertura e fechamento/inativação do canal.

O sítio 2 (IS6 e IVS6) é o local de ligação de diferentes neurotoxinas: graianotoxinas (lipossolúvel), acotinina, batracotoxina, o alcalóide veratridina (extraído de uma Liliaceae). A veratrina é uma mistura do alcalóide cevadina, veratridina, cevadilina, sabadina e cevina, todos extraídos da *Schoenocaulon officinale* (Merck index, 2002).

Estudos evidenciam o envolvimento do segmento 6 do domínio I (IS6) e do segmento 6 do domínio IV (IVS6) na formação do sítio 2. Isto sugere que o bloqueio da inativação induzida por este grupo de toxinas é decorrente de sua interação com o segmento transmembrana IVS6 que é requerido para rápida inativação.

As toxinas lipossolúveis que agem no sítio 2 sob os canais de sódio são moduladores alostéricos da função do canal. Elas se ligam em sítios que são distintos dos poros ou dos sensores de voltagem e favorecem o deslocamento do equilíbrio para o estado de abertura do canal de sódio através de interações alostéricas indiretas. A proposta inicial deste mecanismo de ação das toxinas provém da persistente ativação dos canais de sódio pelas toxinas lipossolúveis. Estudos demonstram que as toxinas agem como agonistas totais ou parciais causando persistente ativação dos canais de sódio (Cestèle e Caterall, 2000).

2.6. Teste de Natação Forçada Modificado

O teste de natação forçada (TNF) foi descrito, inicialmente, por Porsolt e cols. (1977) e consiste na observação de que animais (ratos) colocados em um recipiente com água com profundidade suficiente (18 cm) que impeça seu escape desenvolvem uma postura de imobilidade. Esta imobilidade seria comparável a um estado de desamparo comportamental, como visto nos quadros depressivos no ser humano. Este é um dos modelos animais mais empregados para evidenciar atividade antidepressiva de drogas.

A depressão é definida clinicamente como uma patologia complexa que se apresenta com sintomas psicológicos, somáticos e alterações neuroendócrinas (cortisol,

hormônio adrenocorticotrófico -ACTH-, etc) que são difíceis de serem reproduzidos em animais. Somente comportamentos específicos (endofenótipos) podem ser mensurados (Bourin et al., 2005). O termo “endofenótipo” foi descrito como um fenótipo intermediário entre genes e as patologias. Esta noção dá suporte a exploração de mudanças comportamentais específicas nos animais que modelam aspectos específicos dos transtornos (Einat e Manji, 2006).

Os requisitos mínimos na validação de um modelo animal de depressão foram propostos por McKinney e Bunny há mais de 30 anos:

- O modelo deve ser razoavelmente análogo ao transtorno no ser humano em sua sintomatologia (validade de face).
- Causar alterações comportamentais que podem ser monitoradas objetivamente.
- Produzir alterações comportamentais que são revertidas com algum tipo de tratamento que é efetivo no ser humano (validade preditiva).
- Deve ser reproduzível por diferentes investigadores. (Deussing, 2006)

Conforme proposto por Willner (1984) a validade preditiva é considerada o nível “mais baixo” de validação e corresponde ao isomorfismo farmacológico, ou seja, todas as manipulações farmacológicas- especialmente as terapêuticas -, que sabidamente influem na doença – devem ter efeito similar no modelo (Salgado et al., 2006).

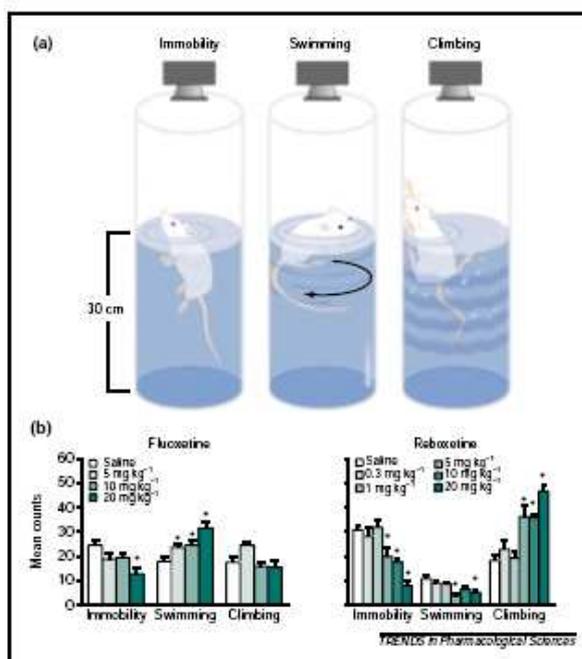
A sensibilidade do TNF a uma ampla gama de drogas antidepressivas é um dos mais importantes aspectos que suportam seu uso no screening (triagem) de novos antidepressivos (Cryan et al., 2002, 2005). Tratamentos clinicamente efetivos para depressão são detectados pelo TNF, incluindo: antidepressivos tricíclicos, antidepressivos inibidores da monoaminoxidase, antidepressivos atípicos, e tratamentos somáticos como eletroconvulsivoterapia, privação do sono REM, exercício e estimulação magnética transcranial. O tratamento com antidepressivos reduz o tempo total de imobilidade e prolonga o comportamento de escape no TNF.

Entretanto, como originalmente descrito, este modelo falhava em detectar os efeitos dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina –ISRS- (Cryan et al., 2002). Detke et al. (1995) e Lucki (1997) propuseram algumas modificações

que pudessem aumentar a sua sensibilidade na detecção dos efeitos antidepressivos promovidos pelos ISRS, a saber: aumentaram a profundidade de água para 30 cm, observaram o comportamento predominante a cada intervalo de 5s. Estas modificações permitiram distinguir comportamentos específicos denominados: (1) Imobilidade, definido como movimentos mínimos necessários para manter o animal com a cabeça sob a superfície da água; (2) Natação, definida pelos movimentos usualmente horizontais ao redor do tanque de água, incluindo travessias de um quadrante para outro; e (3) Escalada que seriam movimentos de impulso dirigidos para lateral do cilindro de água (figura 4).

O grande avanço do TNF modificado em relação ao tradicional é que revela que agentes que aumentam a transmissão de catecolaminas diminuem a imobilidade com aumento do comportamento de escalada, enquanto drogas que aumentam a transmissão serotoninérgica, como ISRS, diminuem a imobilidade com aumento do comportamento de natação.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO .



NOTA: Extraído do trabalho de Cryan et al., 2002.

3. OBJETIVO

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar o possível mecanismo de ação antidepressivo da lamotrigina, avaliar a participação dos canais de Na voltagem dependente e do óxido nítrico no efeito serotoninérgico/noradrenérgico da lamotrigina.

Neste sentido, foi empregado o teste de natação forçada modificado (TNF) como modelo experimental e como ferramentas farmacológicas:

- Veratrina: um ativador de canais de sódio voltagem dependentes, para avaliar a participação do bloqueio dos canais de Na⁺ voltagem dependentes;
- Carbamazepina foi empregada para estabelecer um padrão comportamental no TNF modificado de drogas bloqueadoras de canais de sódio;
- Dizolcipina foi empregada para estabelecer um padrão comportamental no TNF modificado de drogas glutamatérgicas;
- Nortriptilina foi empregada para estabelecer um padrão comportamental no TNF modificado de drogas que aumentam a neurotransmissão noradrenérgica;
- L-arginina, precursor da síntese de óxido nítrico, para avaliar o papel da inibição do NO pela lamotrigina;
- Nitroprussiato, um doador direto de óxido nítrico, para avaliar o papel da inibição do NO pela lamotrigina.

O teste de campo aberto foi empregado como controle para influência de efeitos motores (campo aberto) no comportamento dos animais no TNF modificado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 90 a 120 dias de idade. Estes animais foram separados em grupos de 5 em gaiolas de polipropileno, sob condições controladas

de luz (ciclos 12H claro/escuro, claro às 7:00 a.m.) e temperatura (22°). Os animais tiveram livre acesso à água e comida durante o experimento.

Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo e cada animal foi utilizado uma única vez.

O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (Processo n° 145/2006).

Drogas

Lamotrigina (Cristália) foi dissolvida em 0,5% de carboximetilcelulose, 0,4% tween 80, 0,9% de salina, a qual foi utilizada como solução-controle no teste de natação forçada modificado.

Dizolcipina (Sigma) foi dissolvida em salina.

L-arginina (Sigma) foi dissolvida em salina.

Veratrina (Sigma) foi dissolvida em solução fisiológica (0,9% NaCl), a qual foi usada como solução controle no teste de natação forçada modificado.

Carbamazepina (Cristália) foi dissolvida em 0,1% de tween 80 e água destilada.

Nitroprussiato (Cristália) foi dissolvido em salina.

Nortriptilina (Novartis) foi dissolvida em salina.

Como controles foram utilizados o veículo e a salina. Todas as drogas foram preparadas próximas ao uso, para evitar possíveis fatores interferentes (reações de oxidação, hidrólise, etc) que pudessem alterar seus efeitos.

As drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) num volume constante (1,0 ml/Kg). As doses das drogas foram selecionadas a partir de experimentos anteriores de nosso laboratório (lamotrigina, dizolcipina, nortriptilina) ou a partir da literatura (veratrina 0,01 mg/Kg (Mirza e cols, 2005), L-arginine 500 mg/Kg (Harkin e cols, 1999), carbamazepina (Barros e Leite, 1987). Nos experimentos em que houve

associação de drogas a primeira droga (veratrina e L-arginina) foi administrada 10 minutos antes da segunda droga (lamotrigina e carbamazepina). Nos experimentos com nitroprussiato, o mesmo foi administrado 5 minutos antes da lamotrigina em virtude de sua meia-vida curta.

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Teste de Natação forçada modificado

Os animais foram colocados em um cilindro de PVC (21x46 cm) preenchido com água ($22^{\circ} \pm 2$) a uma profundidade de 30 cm. Esta profundidade impede que os ratos se apoiem ao fundo do cilindro, resultando em uma maior movimentação dos mesmos no cilindro de natação. Os ratos foram colocados no cilindro para uma sessão pré-teste (treino) durante 15 minutos. Após 24 horas da primeira exposição os animais foram recolocados no cilindro durante 5 minutos (sessão teste) e seus comportamentos foram monitorados por uma câmera localizada acima do cilindro. Após a sessão treino os animais foram distribuídos randomicamente aos grupos experimentais e tratados com as diferentes drogas. A administração das drogas foi feita por via intraperitoneal (IP) nos tempos 23:30 horas, 5 horas e 1 hora antes da sessão teste (24 horas). O comportamento predominante foi registrado a cada 5s da sessão teste, perfazendo 60 observações.

Todos os experimentos foram filmados e posteriormente analisados por dois experimentadores sendo um em condição “cega”, obrigatoriamente.

Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 12:00 horas.

5.2. Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora foi mensurada pelo teste do campo aberto. O campo aberto consiste numa arena retangular (50x40x63 cm) construída de madeira (3 paredes e

o piso) e uma frente de vidro (50x52 cm). O piso é dividido por linhas que perfazem 20 pequenos quadrantes (10x10 cm). Os ratos foram colocados individualmente no centro do campo aberto e sua locomoção (número quadrantes atravessados) foi determinada durante o período de 5 minutos. Somente foram computadas as passagens completas, ou seja, aquelas em que os animais ultrapassassem com as 2 patas dianteiras e traseiras para o próximo quadrante. O campo aberto foi lavado com solução alcoólica a 10% antes do teste comportamental, de modo a evitar possíveis interferentes decorrentes de odor e/ou resíduos deixados pelos ratos testados anteriormente. As drogas foram administradas 1 hora antes da sessão teste.

Os testes foram filmados para análise posterior; todos os experimentos foram realizados entre 8:00 e 16:00 horas.

5.3. Análise Estatística

Os dados paramétricos (comportamento de imobilidade e atividade locomotora no campo aberto, etc.) foram analisados por meio do Teste t Student, ou ANOVA de uma via, seguido pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls. Os dados que, por ventura, não preencheram os requisitos para análise paramétrica foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, se necessário. Foram considerados significativos os resultados com $p < 0,05$.

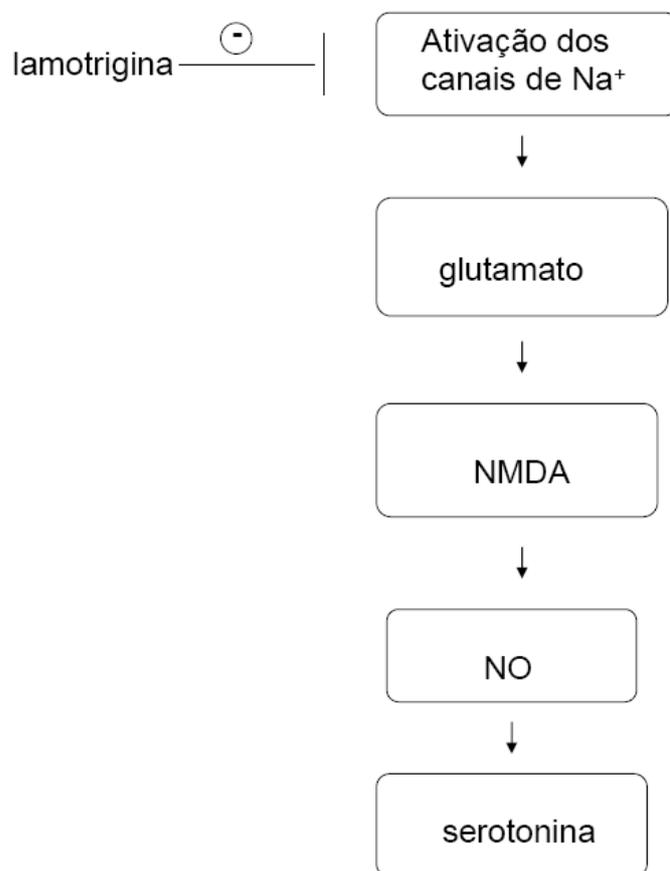
6. HIPÓTESE

A partir de dados da literatura a hipótese estabelecida foi que a ativação sustentada dos canais de sódio voltagem-dependentes levaria a um aumento da liberação de glutamato que por sua vez resultaria na ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA com conseqüente influxo de cálcio. Esse aumento de cálcio intracelular resultaria na ativação de enzimas cálcio-dependentes como a calmodulina e conseqüente ativação da NO sintase. A ativação da NO sintase promoveria a conversão

da L-arginina em L-citrulina com conseqüente liberação de NO. O resultante final de toda esta cascata de eventos seria a diminuição dos níveis de serotonina, possivelmente decorrente do aumento da liberação de NO (mensageiro retrógrado).

A lamotrigina agiria no topo desta cascata, através do bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes inibindo os eventos subseqüentes, e o resultado final seria aumento dos níveis de serotonina (FIGURA 5).

FIGURA 5 - POSSÍVEIS EVENTOS RELACIONADOS A AÇÃO DA LAMOTRIGINA NA DEPRESSÃO.



7. RESULTADOS

7.1. Teste de Natação Forçada modificado

Lamotrigina/Veratrina

Houve diferença significativa entre os tratamentos (gráfico 1) em todos os parâmetros analisados: imobilidade [F (3, 36)= 7,009, $p < 0,001$], natação [F (3, 36)= 3,337, $p < 0,03$] e escalada [F (3, 36)= 5.184, $p < 0,01$]. O teste de post-hoc evidenciou uma diminuição do comportamento de imobilidade do grupo veículo/lamotrigina em relação ao grupo veículo/salina e veículo/veratrina (ambos $p < 0,01$). Houve, ainda, um aumento do comportamento de natação do grupo veículo/lamotrigina em relação ao grupo veículo/salina ($p < 0,05$). Quanto ao parâmetro escalada o grupo veículo/lamotrigina apresentou um aumento deste comportamento em relação aos grupos veículo/salina e veículo/veratrina ($p < 0,05$). Além disso, o grupo veratrina/lamotrigina apresentou um aumento do comportamento de escalada quando comparado aos grupos veículo/salina e veículo/veratrina (ambos $p < 0,05$)

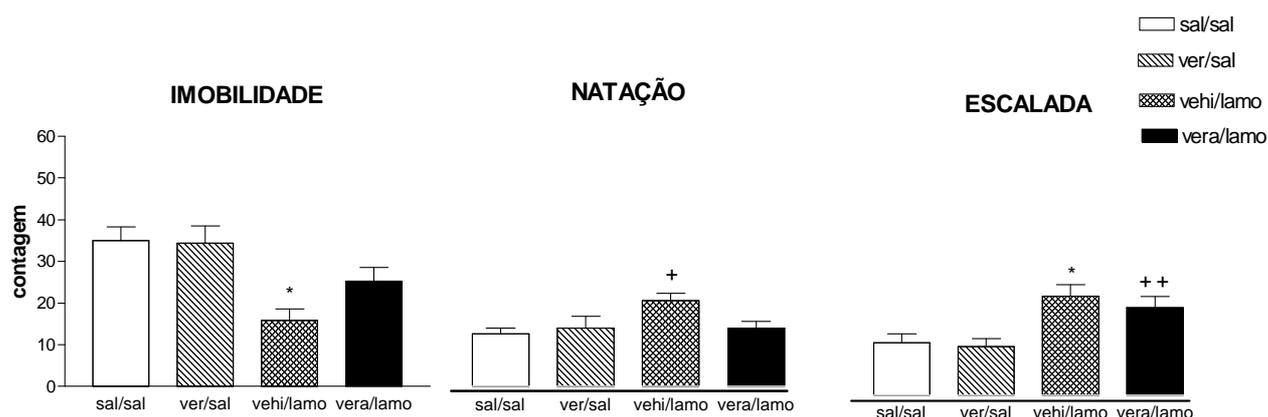


Gráfico 1. Os efeitos da veratrina (0,1 mg/kg), lamotrigina (20 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a imobilidade e comportamentos ativos (natação e escalada) no teste de natação forçada modificado. Todas as barras representam os valores médios com as linhas

verticais indicando o erro padrão da média (n=10/grupo) * p<0,01 veic/lamo vs. sal/sal, ver/sal; + p<0,05 veic/lamo vs. sal/sal; ++ p<0,05 ver/lamo vs. ver/sal, sal/sal (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

L-arginina/lamotrigina

Houve diferença significativa entre os tratamentos (gráfico 2) nos parâmetros imobilidade (K=16,49, p=0,0009) e natação (K=19,69, p<0,01). A análise de post-hoc evidenciou uma diminuição do comportamento de imobilidade do grupo veículo/lamotrigina quando comparado ao grupo salina/salina (p<0,05), e do grupo L-arginina/lamotrigina quando comparado aos grupos salina/salina (p<0,01) e L-arginina/salina (p<0,05). Houve, ainda, um aumento do comportamento de natação do grupo veículo/lamotrigina em relação ao grupo salina/salina (p<0,01), e do grupo L-arginina/lamotrigina em relação aos grupos salina/salina (p<0,01) e L-arginina/salina (p<0,05).

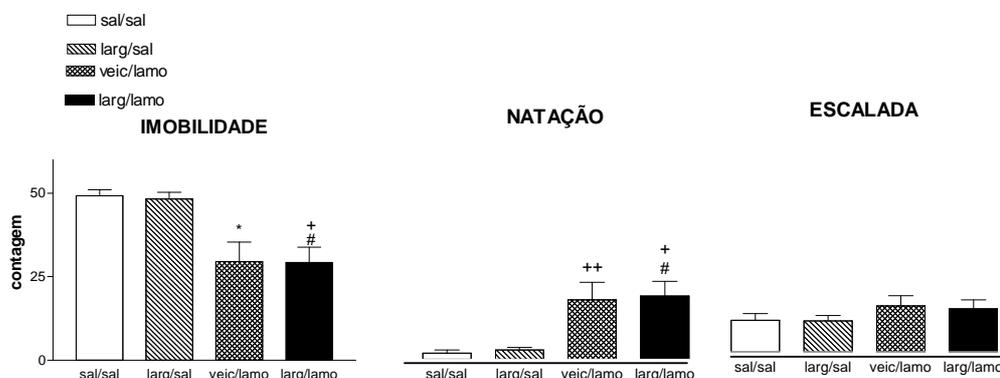


Gráfico 2. Os efeitos da L-arginina (500 mg/kg), lamotrigina (20 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a imobilidade e comportamentos ativos (natação e escalada) no teste de natação forçada modificado. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=10/grupo) * p<0,05 veic/lamo vs. sal/sal; ++ p<0,01 veic/lamo vs. sal/sal; # p<0,01 L-arg/lamo vs. sal/sal; + p<0,05 L-arg/lamo vs. L-arg/sal (os parâmetros imobilidade e natação foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis

seguidos do teste de Dunn e o comportamento de escalada foi analisado por ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls).

Nitroprussiato/lamotrigina

Houve diferença significativa entre os grupos em todos os parâmetros analisados (gráfico 3): imobilidade [$F_{(3,36)} = 8,831, P < 0,01$], natação [$F_{(3,36)} = 4,118, p < 0,01$] e escalada [$F_{(3,36)} = 4,870, P < 0,01$]. A análise de post-hoc evidenciou que a lamotrigina produziu um efeito anti-imobilidade e promoveu o aumento do comportamento de natação quando comparada a todos os outros grupos ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Quanto ao parâmetro escalada o grupo veículo/lamotrigina só diferiu do grupo nitroprussiato/salina ($p < 0,01$).

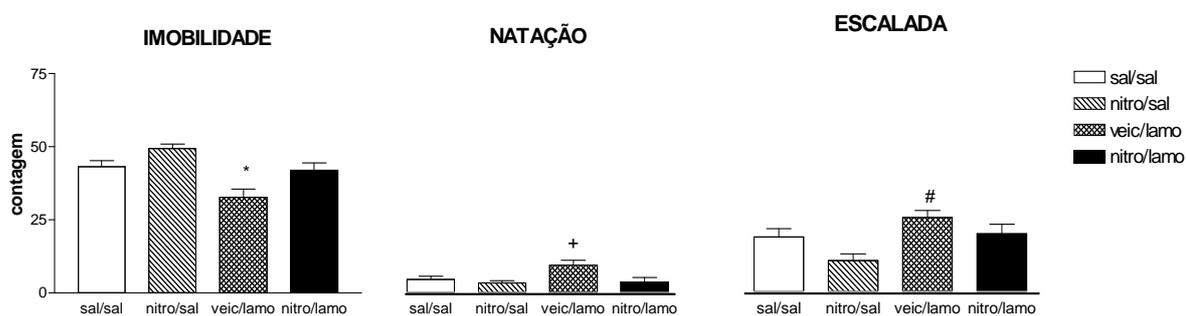


Gráfico 3. Os efeitos do nitroprussiato (2 mg/Kg), lamotrigina (20 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a imobilidade e comportamentos ativos (natação e escalada) no teste de natação forçada modificado. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=10/grupo) * $p < 0,01$ veic/lamo vs. sal/sal, nitro/sal e nitro/lamo; + $p < 0,05$ veic/lamo vs. sal/sal, nitro/sal e nitro/lamo; # $p < 0,01$ veic/lamo vs. nitro/sal (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls).

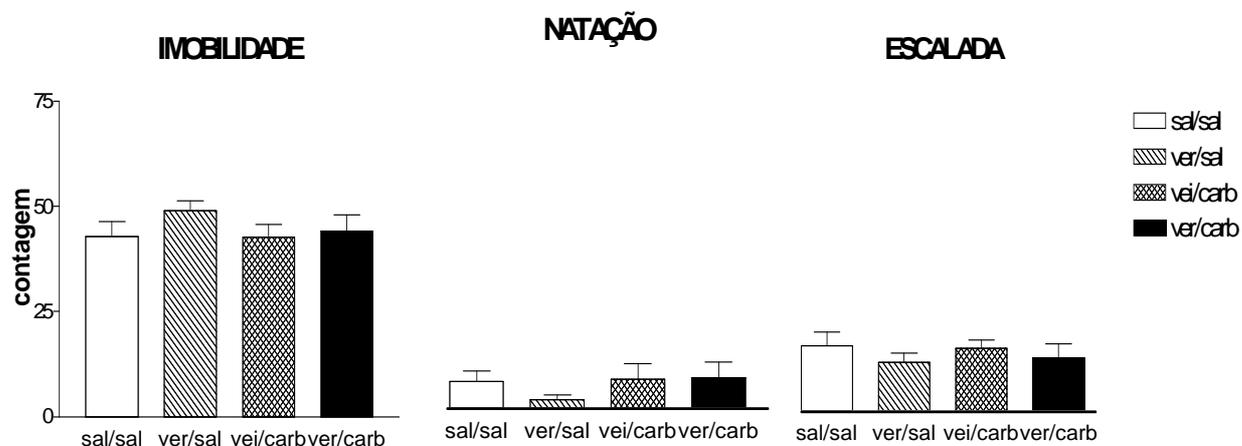


Gráfico 4. Os efeitos da veratrina (0,1mg/Kg), carbamazepina (40 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a imobilidade e comportamentos ativos (natação e escalada) no teste de natação forçada modificado. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=8/grupo, ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls).

Veratrina/carbamazepina

Tanto a carbamazepina isolada (veículo/carbamazepina), quanto associada a veratrina não apresentou efeitos significativos em nenhum dos parâmetros analisados no NTF modificado (gráfico 4). Imobilidade $F_{(3,28)} = 0,8166$ $p = 0,4956$; natação $F_{(3,28)} = 0,6093$ $p = 0,6145$ e escalada $F_{(3,28)} = 0,4633$ $p = 0,7102$.

Dizolcipina

A dizolcipina (gráfico 5) significativamente diminui a imobilidade ($t_{(22)} = 2,265$, $p < 0,05$) e aumentou o comportamento de natação ($t_{(22)} = 2,453$, $p < 0,05$).

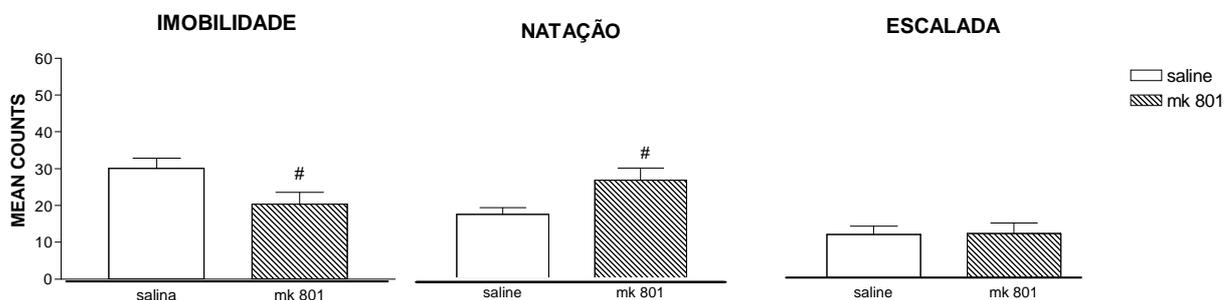


Gráfico 5. Os efeitos da dizolcipina (0,01mg/Kg) sobre a imobilidade e comportamentos ativos (natação e escalada) no teste de natação forçada modificado. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=10/grupo) # p<0,05 MK801 vs. sal (teste t-Student).

Veratrina/Dizolcipina

Tanto a dizolcipina isolada (veículo/dizolcipina), quanto associada a veratrina não apresentou efeitos significativos em nenhum dos parâmetros analisados no TNF modificado (gráfico 6). Imobilidade $F_{(3)} = 0,03638$ $p > 0,05$; natação $F_{(3)} = 0,1187$ $p > 0,05$ e escalada $F_{(3)} = 0,8887$ $p > 0,05$.

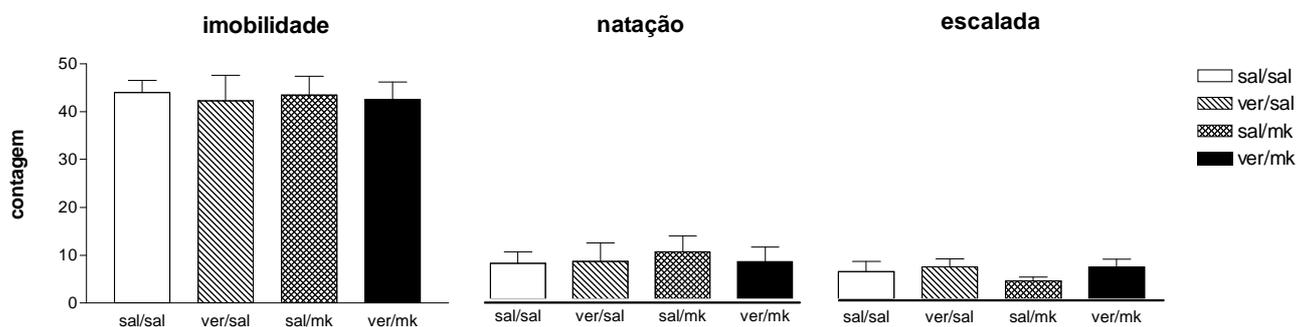


Gráfico 6 -Efeitos da veratrina (0,01 mg/Kg), dizolcipina e veículos, isoladamente ou em associação sobre a imobilidade e comportamentos ativos no teste de natação forçada modificado.

Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o desvio padrão da média (grupos sal/sal e ver/sal n=8 e sal/MK 801 e ver/MK 801 n=13; ANOVA de uma via).

Nortriptilina

A nortriptilina (gráfico 7) reduziu a imobilidade ($t_{(14)}=2,785$, $p<0,05$) e aumentou o comportamento de escalada ($t_{(14)}=3,460$, $p<0,01$) .

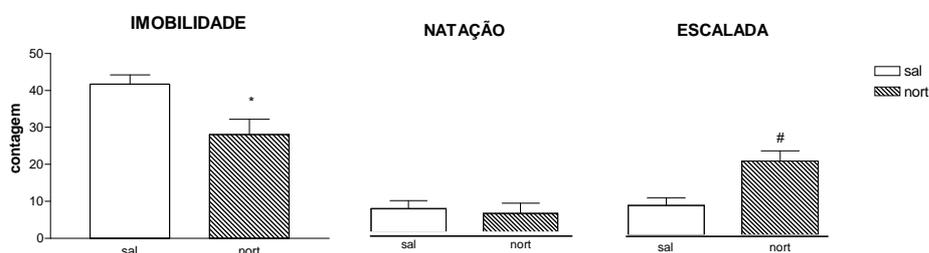


Gráfico 7. Os efeitos da nortriptilina (20 mg/Kg) sobre a imobilidade e comportamentos ativos (natação e escalada) no teste de natação forçada modificado. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=10/grupo) * $p<0,05$ nort. vs. sal.; # $p<0,01$ nort. vs. sal. (teste t-Student).

7.2. Campo Aberto

Nenhum efeito significativo foi observado nos tratamentos com veratrina/lamotrigina (gráfico 8) [$K= 6,810$ $P>0,05$], L-arginina/lamotrigina (gráfico 9) [$F_{(3)}= 0,1901$ $P>0,05$], nitroprussiato/lamotrigina (gráfico 10) ($F_{(3)}= 0,1231$ $P>0,05$), veratrina/carbamazepina (gráfico 11) [$F_{(3)}= 0,6045$ $p>0,05$], dizolcipina (gráfico 12) [$t_{(9)}= 0,9701$ $p>0,05$] e veratrina/dizolcipina (gráfico 13) [$F_{(3)}= 0,1317$ $P> 0,05$] nas doses utilizadas.

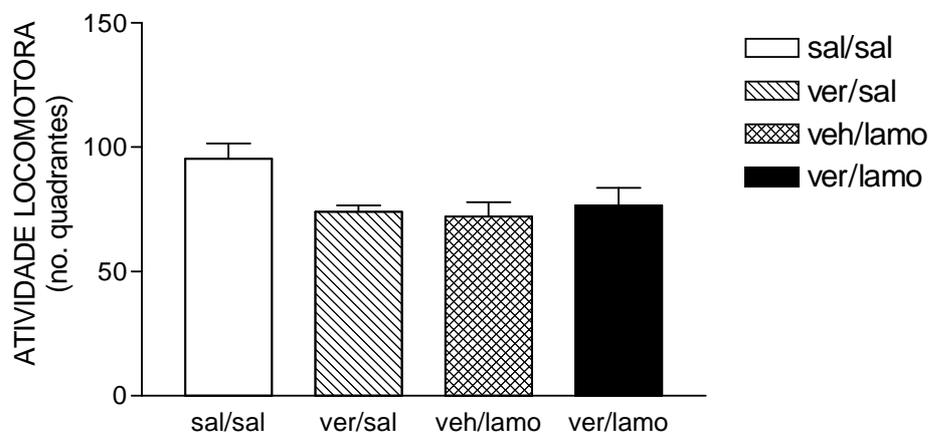


Gráfico 8. Os efeitos da veratrina (0,1mg/Kg), lamotrigina (20 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a atividade locomotora em ratos. A atividade locomotora foi contada durante 5 minutos. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=10/grupo, teste de Kruskal-Wallis).

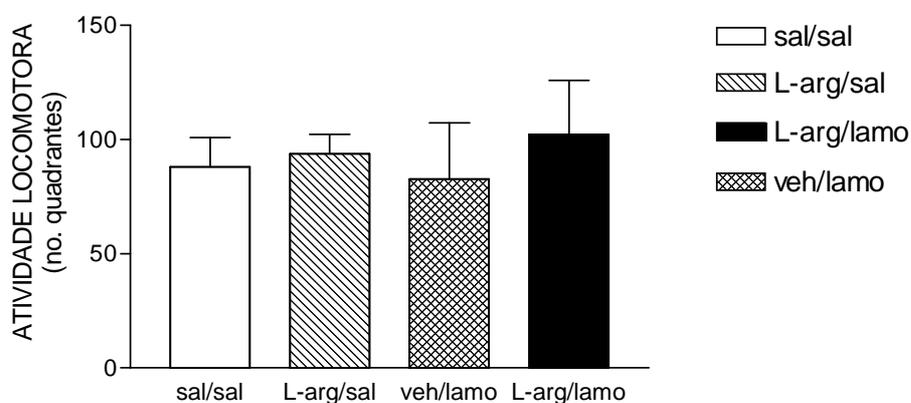


Gráfico 9. Os efeitos da L-arginina (500 mg/Kg), lamotrigina (20 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a atividade locomotora em ratos. A atividade locomotora foi contada durante 5 minutos. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=5/grupo sal/sal e L-arg/sal e n=6 grupo veic/lamo e L-arg/lamo, ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls).

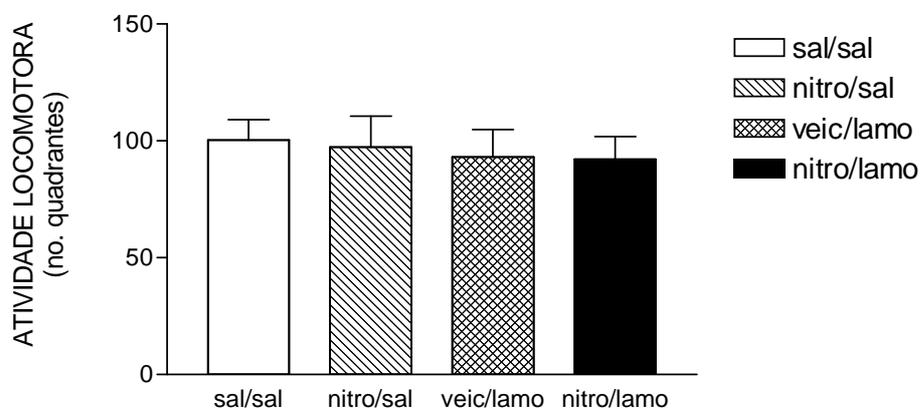


Gráfico 10. Os efeitos do nitroprussiato (2 mg/Kg) e lamotrigina (20 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a atividade locomotora em ratos. A atividade locomotora foi contada durante 5 minutos. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=7/grupo, ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls).

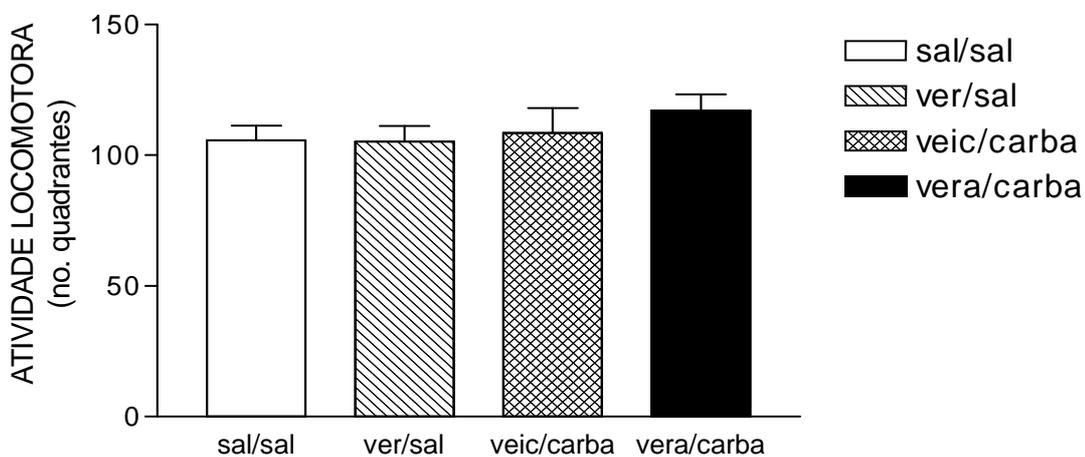


Gráfico 11. Os efeitos da veratrina (0,1 mg/Kg) e carbamazepina (40 mg/Kg) e veículos, isoladamente ou em associação sobre a atividade locomotora em ratos. A atividade locomotora

foi contada durante 5 minutos. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n= 7 /grupo, ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls).

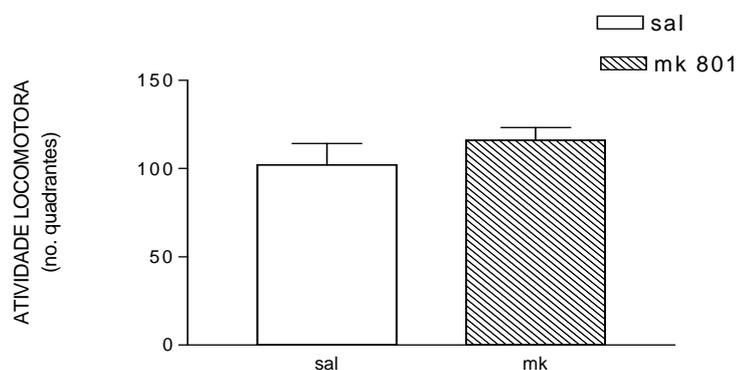


Gráfico 12. Os efeitos da dizolcipina (0.01 mg/Kg) sobre a atividade locomotora em ratos. A atividade locomotora foi contada durante 5 minutos. Todas as barras representam os valores médios com as linhas verticais indicando o erro padrão da média (n=10/grupo, teste t-Student).

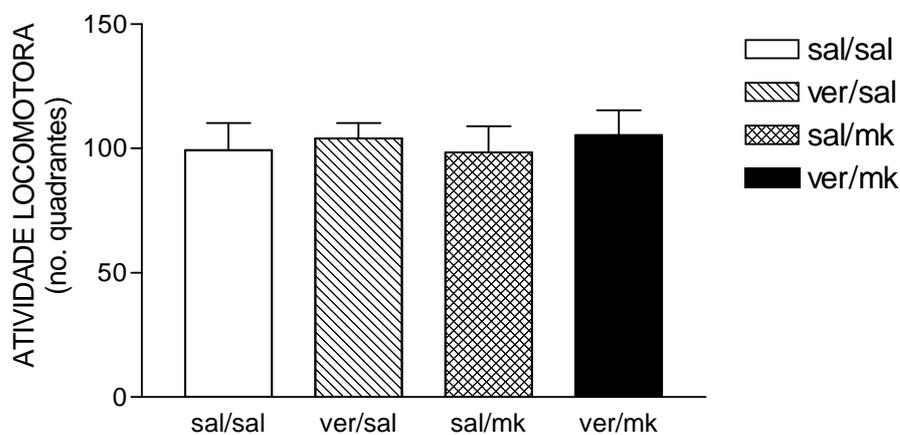


Gráfico 13. Efeitos da dizolcipina-MK 801- (0,01 mg/Kg) e veratrina (0,1 mg/Kg) isoladamente ou em associação sobre a atividade locomotora em ratos. Todas as barras representam os valores

médios com as linhas verticais indicando o desvio padrão das médias (n=9/grupo, exceto salina/salina n=7, teste t-Student).

TABELA 2- RESUMO DOS RESULTADOS TNF MODIFICADO.

Tratamento	Imobilidade	Natação	Escalada
veic/lamotrigina	↓	↑	↑
veic/lamotrigina	↓	↑	↔
veratrina/lamotrigina	↑	↓	↑
veic/L-arginina	↔	↔	↔
L-arginina/lamotrigina	↓	↑	↔
veic/nitroprussiato	↔	↔	↔
nitroprussiato/lamotrigina	↑	↓	↔
dizolcipina (MK801)	↓	↑	↔
veic/dizolcipina	↔	↔	↔
veratrina/dizolcipina	↔	↔	↔
veic/carbamazepina	↔	↔	↔
veratrina/carbamazepina	↔	↔	↔
nortriptilina	↓	↔	↑

8. DISCUSSÃO GERAL

O efeito antidepressivo da lamotrigina foi demonstrado em estudos clínicos controlados (Calabrese et al., 2003 e 2005). Além disto, diferentes trabalhos usando modelos animais observaram efeitos similares aos antidepressivos clássicos (Bourin et al., 2005; Consoni et al., 2006).

Os estudos pré-clínicos têm procurado “delinear” o provável mecanismo de ação da lamotrigina no que tange ao seu efeito antidepressivo. Grande dificuldade tem sido

encontrada em virtude dos inúmeros (e possíveis) alvos para ação da lamotrigina (glutamato, monoaminas, canais de sódio, gaba, etc).

No presente estudo buscamos determinar o papel dos canais de sódio no efeito antidepressivo da lamotrigina. Procuramos, ainda, avaliar a ação da lamotrigina sob a provável cascata de eventos que se acredita ocorrer após a ativação dos canais de sódio voltagem dependentes.

A lamotrigina na dose de 20 mg/kg apresentou um efeito antidepressivo em todos os experimentos, o que é evidenciado pela diminuição do comportamento de imobilidade no TNF modificado.

O estudo com a veratrina/lamotrigina replica achados anteriores de nosso laboratório que a lamotrigina reduz o comportamento de imobilidade e aumenta o comportamento de natação e escalada, os quais estão relacionados a um aumento da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica, respectivamente (Cryan et., 2002 e 2005; Consoni et., 2006). O pré-tratamento com a veratrina, um ativador dos canais de sódio, foi capaz de reverter o efeito anti-imobilidade da lamotrigina decorrente do bloqueio do aumento do comportamento de natação, um comportamento relacionado à neurotransmissão serotoninérgica. Embora a lamotrigina iniba a recaptação de 5-HT por uma ação direta e isto não está relacionado ao canal de sódio (Southam et al., 1998), esta ação parece não contribuir para o efeito antidepressivo da lamotrigina no TNF modificado. Por sua vez, o comportamento de escalada, que é relacionado a ação catecolaminérgica, não foi alterado pelo pré-tratamento com a veratrina. Esses resultados sugerem que somente a ação serotoninérgica da lamotrigina está relacionada a sua capacidade de bloquear os canais de sódio voltagem-dependentes e a redução da liberação de glutamato. Isto está de acordo com a hipótese que propõe que o efeito antidepressivo das drogas antilutamatérgicas decorre, em parte, da diminuição da neurotransmissão glutamatérgica, seguida da redução dos níveis de óxido nítrico (NO) e um aumento da neurotransmissão serotoninérgica (Consoni et al., 2006; Almeida et al., 2006). Esta hipótese é suportada por algumas evidências: a) o efeito anti-imobilidade da memantina, um antagonista NMDA não competitivo, parece ser mediado pela síntese de NO (Almeida et

al., 2006); b) o efeito anti-imobilidade dos inibidores de NO é revertido pela depleção de serotonina (Harkin et al., 2003); c) os inibidores de NO potencializam o efeito anti-imobilidade das drogas inibidoras seletivas da recaptação de serotonina (fluoxetina, sertralina e citalopram), mas não o da reboxetina, um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina (Harkin et al., 2004).

Em contrapartida, o presente estudo contradiz os dados de Ahmad et al. (2004), os quais mostram que a administração simples de lamotrigina (10-20 mg/Kg) diminui os níveis extracelulares de 5-HT no hipocampo e não altera o aumento de serotonina provocado pela veratridina (um outro ativador de canais de sódio). Entretanto, no segundo dia do tratamento, a lamotrigina (5 mg/kg, 2 vezes ao dia) foi capaz de aumentar os níveis extracelulares de 5-HT, apesar de continuar sem efeito sobre o aumento nos níveis de 5-HT evocados pela veratridina. É importante destacar que o esquema utilizado no presente estudo (3 administrações de drogas no período das 24 horas) se assemelha mais com o encontrado no segundo dia de tratamento do que com a administração simples empregada por Ahmad et al. (2005).

Diferentemente, a ação noradrenérgica da lamotrigina parece ser independente da liberação de glutamato, e pode decorrer de uma ação direta sobre a recaptação de monoaminas (Southam et al., 1998). Além disso, esses resultados sugerem que os efeitos serotoninérgicos e noradrenérgicos sejam independentes um do outro.

Embora as vias neuroquímicas relacionadas ao efeito da lamotrigina (aumento da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica) pareçam similares aos dos inibidores da recaptação de monoaminas, a lamotrigina tem, aparentemente, um perfil antidepressivo melhor em estudos clínicos, uma vez que não induz mania/hipomania/estados mistos ou ciclagem rápida (Herman, 2004).

O efeito dual (noradrenérgico/serotoninérgico) da lamotrigina evidenciado em estudos anteriores de nosso laboratório (Consoni et al., 2006) somente foi reproduzido no experimento com veratrina e lamotrigina. Uma das possíveis explicações para este fato provém da alteração do “plantel” de animais provenientes de nosso biotério, ocorrido após os experimentos com a lamotrigina e veratrina.

Por outro lado, todos os experimentos realizados após a mudança do “plantel” de animais demonstraram um efeito antidepressivo da lamotrigina, decorrente do aumento da neurotransmissão serotoninérgica (o que pode ser evidenciado com o aumento do comportamento de natação no NTF modificado).

Outros trabalhos demonstram a participação serotoninérgica e noradrenérgica no efeito antidepressivo da lamotrigina (Bourin et al., 2005; Kaster et al., 2007).

Bourin et al. (2005) indicaram a participação dos receptores 5-HT_{1A} no efeito anti-imobilidade da lamotrigina, enquanto que Kaster et al. (2007) sugerem uma mediação dos receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ pós-sinápticos.

O tratamento crônico com lamotrigina em ratos leva a uma diminuição da densidade de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} localizados no córtex frontal, porém nenhuma alteração foi observada no hipocampo (Vinod e Subhash, 2002).

É sabido que animais de linhagens diferentes apresentam comportamentos diferentes aos diversos tipos de estressores. Isto é observado em diferentes estudos utilizando o TNF. López-Rubacalva e Lucki (2000) verificaram comportamentos diferentes, no NTF modificado de duas linhagens de ratos: Wistar Kyoto e Sprague-Dawley tanto em condições basais (Wistar Kioto menos ativos, Sprague-Dawley mais ativos) como quando submetidos ao tratamento com drogas antidepressivas consideradas padrão (desipramina e fluoxetina). Interessantemente, a linhagem Wistar Kyoto foi responsiva a desipramina, porém demonstrou uma resposta reduzida e inconstante ao antidepressivo fluoxetina. O mesmo não ocorreu na linhagem Sprague-Dawley em que a fluoxetina apresentou uma redução dose-dependente da imobilidade e um aumento do comportamento de natação.

Isto sugere que ratos de diferentes linhagens podem apresentar grande variabilidade de respostas comportamentais frente a diferentes antidepressivos, apesar da seletividade farmacológica destas drogas. De modo semelhante, outro estudo (David et al., 2003) também encontrou diferenças em camundongos de diferentes linhagens (Swiss, NMRI, DBA/2, C57BL/6JRj) tratados com 5 diferentes antidepressivos (desipramina, imipramina, citalopram, paroxetina e bupropiona). Os camundongos Swiss foram os mais

sensíveis aos efeitos dos antidepressivos, a linhagem C57BL/6JRj foi sensível, somente, aos efeitos da bupropiona, e a linhagem NMRI aos efeitos da paroxetina. A linhagem DBA/2 não respondeu a nenhum tratamento antidepressivo no NTF, o que pode ser explicado pelas altas concentrações basais de serotonina, dopamina e noradrenalina cerebrais encontradas nestes animais.

Estudos evidenciam que a sensibilidade a drogas antidepressivas é genótipo dependente (López-Rubacalva e Lucki, 2000; David et al., 2003; Hinojosa et al., 2006), o que pode explicar a diferença de padrão comportamental dos ratos submetidos ao tratamento com lamotrigina, em nosso estudo. Embora estes animais sejam da mesma linhagem seus repertórios genéticos são diferentes.

Uma vez que não conseguimos reproduzir os efeitos noradrenérgicos da lamotrigina evidenciado por Consoni et al. (2006) utilizamos nortriptilina como droga padrão para avaliar a sensibilidade destes animais aos efeitos comportamentais decorrentes do aumento da neurotransmissão noradrenérgica. A administração da mesma levou a um efeito anti-imobilidade e um aumento do comportamento de escalada, como esperado.

Embora estes dados indiquem que os animais utilizados sejam sensíveis às drogas noradrenérgicas e estejam de acordo com as observadas por Consoni et al. (2006), em virtude da falta de uma curva dose-resposta, existe a probabilidade de uma alteração da sensibilidade (isto é, deslocamento da curva para a direita).

Outra possibilidade seria a perda da atividade do lote da droga utilizada o que seria pouco provável, visto que a mesma foi utilizada por Kaster et al. (2007) para avaliação da atividade noradrenérgica.

O glutamato, agindo através de seus receptores NMDA, parece ser o principal sinal para ativação da produção de NO neuronal (Bujas-Bobanovic et al., 2000). O NO parece ter um papel crucial nas vias bioquímicas que resultam em diversas doenças psiquiátricas como esquizofrenia (Bujas-Bobanovic et al., 2000), dependência química (Chan et al., 2004) e depressão (Harkin et al., 1999 e 2003; Da Silva et al., 2000).

Uma das ações mais determinantes da lamotrigina é sua capacidade de diminuir a liberação de glutamato, o que é comprovado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Ahmad et al., 2005 e 2006; Lizasoain et al., 1995).

Em nossos experimentos, a administração do antagonista alostérico dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA - dizolcipina (0,01 mg/Kg)- resultou numa diminuição do comportamento de imobilidade com um aumento do comportamento de natação no NTF modificado, perfil semelhante aos ISRS (fluoxetina, paroxetina) e aos inibidores da NO sintase (7-NI e L-NAME).

As drogas inibidoras da NO sintase apresentam efeito antidepressivo no teste da natação forçada (Harkin et al., 1999 e 2003) com um perfil comportamental semelhante ao dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina no TNF modificado (diminuição no comportamento de imobilidade e aumento no comportamento de natação) efeito que é revertido pela depleção de 5-HT pela administração de PCPA (para-cloro-fenilalanina - um inibidor da síntese de serotonina-). Portanto, procuramos determinar a participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antidepressivo da lamotrigina. Para tanto utilizamos a L-arginina (500 mg/Kg), um substrato para ação da NO sintase e conseqüente síntese de NO, e o nitroprussiato um doador de NO de ação direta.

A administração de L-arginina (500 mg/kg) antes da administração de lamotrigina (20 mg/Kg) apresentou um efeito semelhante ao da lamotrigina quando utilizada isoladamente, resultando numa diminuição do comportamento de imobilidade e aumento no comportamento de natação (indicando um aumento da neurotransmissão serotoninérgica).

A dose de L-arginina, por nós selecionada, foi obtida do trabalho de Harkin et al. (1999) os quais afirmavam que o antagonismo associado com a L-arginina (em relação aos inibidores da NO sintase) requer um excesso de substrato no intuito de obter a reversão do seu efeito.

Entretanto, a L-arginina apresenta efeito dual, sendo que em baixas doses apresenta um efeito antidepressivo e em altas doses apresenta um efeito depressor no teste de natação forçada (Ergun e Ergun, 2007).

As doses de L-arginina que resultam em seu efeito bifásico variam entre diferentes estudos. Da Silva et al. (2000) utilizando as doses de 250 e 500 mg/kg observaram um efeito antidepressivo no TNF e no teste de suspensão em cauda em camundongos e, já nas doses de 750 e 1000 mg/kg o efeito observado foi pró-depressor. Em outro estudo (Inan et al., 2004) baixas doses (25 mg/Kg) provocaram um efeito depressor e altas doses (500 e 1000 mg/Kg) resultaram num efeito antidepressivo. Embora os resultados obtidos com a L-arginina em diferentes estudos sejam paradoxais (isto pode decorrer das diferentes condições experimentais e linhagens de animais) é importante observar que o efeito pró-depressor em altas doses seja mais plausível (Ergun e Ergun, 2007).

Em nosso trabalho a L-arginina, *per se*, não apresentou qualquer tipo de efeito antidepressivo em todos os parâmetros analisados no TNF modificado quando comparada ao grupo salina, o que sugere que a dose utilizada foi corretamente selecionada.

Outra possibilidade para ausência do efeito da L-arginina, em nosso estudo, pode ser decorrente da inibição indireta da NOS pela lamotrigina, de forma que a L-arginina não competiria pelo mesmo sítio de ação da lamotrigina (Lizasoain et al., 1995).

Quando administramos nitroprussiato, um doador de NO, previamente a administração da lamotrigina, houve uma reversão do efeito antidepressivo da lamotrigina (aumento do comportamento de imobilidade e diminuição do comportamento de natação) no TNF modificado. Semelhantemente, o nitroprussiato foi capaz de reverter a hiperlocomoção induzida por fenilciclidina (PCP), um antagonista NMDA, e tolueno utilizados em modelos animais de esquizofrenia e dependência química, respectivamente (Bujas-Bobanovic et al., 2000 e Chan et al., 2004).

In vitro, o nitroprussiato foi capaz de reverter a diminuição de aspartato produzido pela lamotrigina, e de forma contrária o uso do inibidor da NO sintase L-NNA foi capaz de acentuar a diminuição de aspartato pela lamotrigina (Afanas et al., 1999).

Por outro lado, o NO pode modular a atividade do receptor NMDA de uma maneira bifásica, tendo efeitos tanto facilitatórios, quanto inibitórios. O NO pode, ainda, modular a atividade do receptor NMDA de forma a gerar tanto efeitos antidepressivos, quanto depressores ou ainda, um balanço entre estes efeitos “paradoxais” (Ergün e Ergün, 2007). Além disso, o efeito em forma de U da L-arginina (em baixas doses: efeito antidepressivo e altas doses: efeito depressor) pode estar relacionado ao efeito bifásico do NO.

Utilizando o modelo de NTF em camundongos, Almeida et al. (2006), avaliaram o papel da via L-arginina-NO-GMPc no efeito antidepressivo da memantina, um antagonista alostérico do receptor NMDA, e concluíram que a inibição desta via é importante para este efeito. Nossos resultados com lamotrigina se assemelham, em parte, aos efeitos da memantina, uma vez que somente o nitroprussiato (doador de NO) foi capaz de reverter o efeito da lamotrigina.

Na tentativa de estabelecer um padrão comportamental no NTF modificado a drogas bloqueadoras de canais de sódio utilizamos carbamazepina (40 mg/Kg) como “droga de referência”. Nesta dose utilizada, a carbamazepina não apresentou efeito anti- imobilidade e tampouco alterou os comportamentos de natação e escalada. Este resultado é discrepante ao encontrado por Barros e Leite (1987) em ratos e semelhante ao de Redrobe e Bourin (1998) em camundongos. Este último observou, ainda, uma diminuição da locomoção dos animais no teste do campo aberto, o que pode ser interpretado como um possível efeito sedativo da carbamazepina podendo levar a uma falsa interpretação dos seus resultados no NTF (falso negativo). Quando a carbamazepina foi associada a subdoses do agonista $5H_{1A}$ 8-OH-DPAT o efeito antidepressivo foi observado.

Em nosso estudo a carbamazepina, nesta dose, não provocou nenhuma alteração na atividade locomotora dos animais, e a ausência de efeito no NTF não pode ser atribuída ao efeito sedativo da mesma.

Ressaltamos, porém, que o efeito antidepressivo da carbamazepina não pode ser descartado, uma vez que seu congênere oxcarbamazepina tem apresentado efeito antidepressivo em diferentes estudos (Joca et al., 2000; Beijamini et al., 1998).

Para confirmarmos este achado deveríamos realizar uma curva dose-resposta com a carbamazepina e/ou verificar seu efeito diante de um modelo de epilepsia, por exemplo: o modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

Diante destes resultados podemos sugerir que a inibição dos canais de sódio voltagem dependentes pela lamotrigina tem como consequência a diminuição dos níveis de glutamato, o que de forma indireta provoca a inibição da NO sintase. Isto poderia explicar o fato da L-arginina não reverter os efeitos da lamotrigina, uma vez que a produção de NO é dependente da atividade enzimática da NO sintase. Esta hipótese se torna plausível na medida em que o aumento da oferta de NO elicitado pelo nitroprussiato é capaz de reverter o efeito anti-imobilidade da lamotrigina.

9. CONCLUSÕES

- A lamotrigina na dose de 20 mg/kg apresentou uma diminuição significativa no comportamento de imobilidade em todos os experimentos, o que confirma seu efeito antidepressivo.
- A administração de veratrina antes da lamotrigina reverteu seu efeito anti-imobilidade, sugerindo que o bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes pela lamotrigina é fundamental para produção de seu efeito antidepressivo.
- O aumento da neurotransmissão noradrenérgica provocado pela lamotrigina independe do bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes.
- A administração de L-arginina antes da lamotrigina não reverteu o efeito antidepressivo da mesma.
- A administração de nitroprussiato antes da lamotrigina foi capaz de reverter seu efeito antidepressivo, indicando que a inibição da produção/liberação de NO faz parte da cascata de eventos que resultam em seu efeito antidepressivo.
- Tomando em conjunto os resultados obtidos com a administração de veratrina, L-arginina e nitroprussiato sugere-se que a lamotrigina promove uma inibição indireta da NO sintase, e esta inibição é resultante da diminuição da liberação de glutamato e da

diminuição da ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA provocados pelo bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes.

10. BIBLIOGRAFIA

ADELL, A.; CASTRO, E.; CELADA, P.; BORTOLOZZI, A.; PAZOS, A.; ARTIGAS, F. Strategies for producing faster acting antidepressants. **Drug Discovery Today**, v.10, n.8, p.578-585, 2005.

AFANAS'EV, I.; KUDRIN, V.; RAYEVSKY, K.S.; VARGA, V.; SARANSAARI, P.; OJA, S.S. Lamotrigine and carbamazepine affect differently the release of D-[³H] aspartate from mouse cerebral cortex slices: involvement of NO. **Neurochemical Research**, v.24, n°9, p. 1153-1159, 1999.

AHMAD, S.; FOWLER, L.J.; WHITTON, P.S. Lamotrigine, carbamazepine and phenytoin differentially alter extracellular levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and amino acids. **Epilepsy Research**, v.63, p.141-149, 2005.

AHMAD, S.; FOWLER, L.J.; WHITTON, P.S. Effects of combined lamotrigine and valproate on basal and stimulated extracellular amino acids and monoamines in the hippocampus of freely moving rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.371, p.1-8, 2005.

ALMEIDA, R.C., FELISBINO, C.S., LOPEZ, M.G., RODRIGUES, A.L.S., GABILAN, N.H. Evidence for the involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. **Behavioural Brain Research**, v.168, p.318-322, 2006.

ALT, A.; NISENBAUN, E.S.; BLAKMAN, D.; WITKIN, J.M. A role for AMPA receptors in mood disorders. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1273-1288, 2006.

ARBAN, R.; MARAIA, G.; BRACKENBOROUGH, K., WINYARD, L.; WILSON, A.; GERRARD, P.; LARGE, C. Evaluation of the effects of lamotrigine, valproate and carbamazepine in a rodent model of mania. **Behavioural Brain Research**, v.158, p.123-132, 2005.

BARROS, H.M.T.; LEITE, J.R. The effects of carbamazepine on two animal models of depression. **Psychopharmacology**, v.92, p.340-342, 1987.

BEIJAMINI, V.; SKALISZ, L.L.; JOCA, S.R.L.; ANDREATINI, R. The effect of oxcarbazepine on behavioural despair and learned helplessness. **European Journal of Pharmacology**, v. 347, p.23-27, 1998.

BENESKI, D.A.; CATERRALL, W.A. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.77, p.639-643, 1980.

BERTON, O.; NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, p.137-151, 2006.

BOURIN, M.; MASSE, F.; HASCOET, M. Evidence for the activity of lamotrigine at 5-HT_{1A} receptors in the mouse forced swimming test. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v.30, n.4, p.275-282, 2005.

BOWDEN, C.L. Treatment options for Bipolar Depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.66, p.3-6, 2005.

BUJAS-BOBANOVIC, M.; BIRD, D.C.; ROBERTSON, H.A.; DURSUN, S.M. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. **British Journal of Pharmacology**, v.130, p.1005-1012, 2000.

CALABRESE, J.R.; BOWDEN, C.L.; SACHS, G.S.; ASCHER, J.A.; MONAGHAN, E.; RUDD, G.D. A double-blind placebo-controlled study of lamotrigine monotherapy in outpatients with bipolar I depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.60, p.79-88, 1999.

CALABRESE, J.R.; SUPPES, T.; BOWDEN, C.L.; SACHS, G.S.; SWANN, A.C.; MCELROY, S.L.; KUSUMAKAR, V.; ASCHER, J.A.; EARL, N.L.; GREENE, P.L.; MONAGHAN, E.T. A double-blind, placebo-controlled, prophylaxis study of lamotrigine in rapid-cycling bipolar disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.61, p.841-850, 2000.

CALABRESE, J.R.; BOWDEN, C.L.; YATHAM, L.N.; BEHNKE, K.; MEHTONEN, O.P.; MONTGOMERY, P.; PASKA, W.; EARL, N.E.; DEVEAUGH-GEISS, J. A placebo-controlled 18-month trial of lamotrigine and lithium maintenance treatment in recently depressed patients with bipolar I disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.64, p.1013-1018, 2003.

CALABRESE, J.R.; RAPPORT, D.J., YOUNGSTROM, E.A.; JACKSON, K.; BILALI, S.; FINDLING, R.L. New data on the use of lithium, divalproate, and lamotrigine in rapid cycling bipolar disorder. **European Psychiatry**, v.20, p.92-95, 2005.

CAROBREZ, A.P. Transmissão pelo glutamate como alvo molecular na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, p.52-58, 2003.

CATERRALL, W.A. From ionic currents a molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v.26, p.13-25, 2000.

CÈSTELE, S.; CATERRALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v.82, p.883-892, 2000.

CHAN, M-H.; CHIEN, T-H.; LEE, P-Y.; CHEN, H-H. Involvement of NO/cGMP pathway in toluene-induced locomotor hyperactivity in female rats. **Psychopharmacology**, v.176, p.435-439, 2004.

CONSONI, F.T.; VITAL, M.A.B.; ANDREATINI, R. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**, v.16 , p.451-458 , 2006.

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

CRYAN, J.F.; PAGE, M.E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **European Journal of Pharmacology**, v.436, p.197-205, 2002.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, n.5, p.238-245, 2002.

CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.547-569, 2005.

DA SILVA, G.L.; MARTEUSSI, A.S.; DOS SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swim test and in the tail suspension test in mice. **NeuroReport**, v.11, p.3699-3702, 2000.

DAVID, D.J.P.; RENARD, C.E.; JOLLIET, P.; HASCOËT, M.; BOURIN, M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. **Psychopharmacology**, v.166, p. 373-382, 2003.

DEUSSING, J.M. Animal models of depression. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v.3, n.4, p.375-383, 2006.

DU,J.; MACHADO-VIEIRA, R.; MAENG, S.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H.K.; ZARATE JR, C.A. Enhancing AMPA to NMDA throughput as a convergent mechanism

for antidepressant action. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v.3, n.4, p.519-526, 2006.

DU, J.; SUZUKI, K.; WEI, Y.; WANG, Y.; BLUMENTHAL, R.; CHEN, Z.; FALKE, C.; ZARATE JR, C.A.; MANJI, H.K. The anticonvulsants lamotrigine, riluzole and valproate differentially regulate AMPA receptor membrane localization: relationship to clinical effects in mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, August, p.1-10, 2006.

EINAT, H.; MANJI, H.K. Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorders. **Biological Psychiatry**, v.59, p.1160-1171, 2006.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.28, p.435-451, 2004.

ERGÜN, Y.; ERGÜN, U.G.O. Prevention of pro-depressant effect of L-arginine in the forced swim test by N^G-NITRO-L-arginine and [1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]. **European Journal of Pharmacology**, v.554, p.150-157, 2007.

FREY, B.N.; FONSECA, M.M.R.da, MACHADO-VIEIRA, R., SOARES, J.C., KAPCZINSKI, F. Anormalidades neuropatológicas e neuroquímicas no transtorno afetivo bipolar. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.26, n.3, p.180-188, 2004.

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

HARKIN, A.; CONNOR, T.J.; WALSH, M.; ST JOHN, N.; KELLY, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v.44, p.616-623, 2003.

HARTSHORNE, R.P.; CATERRALL, W.A. Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.78, p.4620-4624, 1981.

HERMAN, E. Lamotrigine: a depression mood stabilizer. **European Neuropsychopharmacology**, v.14, p. 89-93, 2004.

HINOJOSA, F.R.; SPRICIGO JR, L.; IZÍDIO, G.S.; BRÜSKE, G.R.; LOPES, D.M.; RAMOS, A. Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 168, p. 127-136, 2006.

HIRSCHFELD, R.M.A. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.61, p.4-6, 2000.

INAN, S.Y.; YALCIN, I.; AKSU, F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide mediated serotonin release and potassium channel modulation. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.77, p.457-464, 2004.

JEZOVA, D.; TOKAREV, D., RUSNACK, M. **Neuroendocrinology**, v.62, p. 326-332, 1995.

JEZOVA, D. Control of ACTH secretion by excitatory amino acids. **Endocrine**, v.28, p.287-293, 2005.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Stress, depression and the hippocampus. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, s.2, p.46-51, 2003.

JOCA, S.R.L.; SKALISZ, L.L.; BEIJAMINI, V.; VITAL, M.A.B.F.; ANDREATINI, R. The antidepressant-like effect of oxcarbamazepine: possible role of dopaminergic neurotransmission. **European Neuropsychopharmacology**, v.10, p.223-228, 2000.

JOCA, S.R.L.; GUIMARÃES, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology**, v.185, p.298-305, 2006.

KASTER, M.P.; RAUPP, I.; BINFARÉ, R.W.; ANDREATINI, R.; RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. **European Journal of Pharmacology**, v.565, p.119-124, 2007.

KEMP, J.A.; McKernan, R.M. NMDA receptor pathways as drug targets. **Nature Neuroscience**, v.5, p. 1039-1042, 2002.

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons? Adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biological Psychiatry**, v.54, p.499-503, 2003.

KETTER, T.A.; MANJI, H.K.; POST, R.M. Potential mechanisms of action of Lamotrigine in the treatment of bipolar disorders. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.23, n.5, 2003.

LIU, G.; YAROV-YAROVY, V.; NOBBS, M.; CLARE, J.J.; SCHEUER, T.; CATERRALL. Differential interactions of lamotrigine and related drugs with

transmembrane segment IVS6 of voltage-gated sodium channels. **Neuropharmacology**, v.44, p.413-422, 2003.

LIZASOAIN, I.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rat forebrain slices. **Journal of Neurochemistry**, v.64, n.º2, p.637-642, 1995.

LOPEZ-RUBALCAVA, C.; LUCKI, IRWIN. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. **Neuropsychopharmacology**, v.22, p.191-199, 2000.

LUCKI, I., O'LEARY, O.F. Distinção entre a atuação da norepinefrina e da serotonina nos efeitos comportamentais das drogas antidepressivas. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.65, p.11-24, 2004.

MACHADO-VIEIRA, R.; SCHWARTZHAUPT, A.W.; FREY, B.N.; LENADRO, J.J.; CERESER, K.M.M.; SILVEIRA, L.N.; ZANATTA, L.M.; GARCIA, P.F.; POLLET, P.; BRAGA, V.F.; CERESER JR., V.H., GAUER, G. Neurobiologia do transtorno de humor bipolar e tomada de decisão na abordagem psicofarmacológica. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, n.25, s.1, p.88-105, 2003.

MACKOWIAK, M.; CHOCYC, A.; MARKOWICZ-KULA, K.; WEDZONY, K. Neurogenesis in the adult brain. **Polish Journal of Pharmacology**, v.56, p.673-687.

MATHEW, S.J.; KEEGAN, K.; SMITH, L. Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.27, n.3, p.243-248, 2005. The Merk Index, 13 ed.

MINEUR, Y.S.; PICCIOTTO, M.R.; SANACORA, G. Antidepressant-like effects of ceftriaxone in male C57BL/6J mice. **Biological Psychiatry**, v.61, p.250-252, 2007.

MIRZA, N.R.; BRIGHT, J.L.; STANHOPE, K.J.; WYATT, A.; HARRINGTON, N.R. Lamotrigine has an anxiolytic-like profile in the rat conditioned emotional response test of anxiety: a potential role for sodium channels? **Psychopharmacology**, v.180, p.159-168, 2005.

NASCIMENTO, C.A.M do; NOGUEIRA, C.W.; BORGES, V.C.; ROCHA, J.B.T. Changes in [³H]-glutamate uptake into platelets from patients with bipolar I disorder. **Psychiatry Research**, v. 141, n.3, p.343-347, 2006.

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

NOWAK, G.; LI, Y.; PAUL, I.A. Adaptation of cortical but not hippocampal NMDA receptors after chronic citalopram treatment. **European Journal of Pharmacology**, v.295, p.75-85, 1996.

PAUL, I.A.; SKOLNICK, P. Glutamate and depression. **Ann.N.Y.Acad.Sci**, v.1003, p.250-273, 2003.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G., BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal Pharmacology**, v.47, n.4, 379-391.

PETIT-DEMOULIERE; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v.177, p.245-255, 2005.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M. Evidence of the activity of lithium on 5-HT_{1B} receptors in the mouse forced swimming test: comparison with carbamazepine and sodium valproate. **Psychopharmacology**, v. 141, p.370-377, 1999.

ROTHSTEIN, J.D.; PATEL, S.; REGAN, M.R.; HAENGGELI, C.; HUANG, Y.H.; BERGLES, D.E.; JIN, L.; HOBERG, M.D.; VIDENSKY, S.; CHUNG, D.S.; TOAN, S.V.; BRUIJN, L.I.; SU, Z.; GUPTA, P.; FISHER, P.B. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. **Nature**, V.433, P.73-77, 2005.

SALGADO, J.V.; HETEM, L.A.; SANDNER, G. Modelos experimentais de esquizofrenia – uma revisão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.28, p. 135-141, 2006.

SOUTHAM, E.; KIRKBY, D.; HIGGINS, G.A.; HAGAN, R.M. Lamotrigine inhibits monoamine uptake in vitro and modulates 5-hydroxytryptamine uptake in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.358, n.1, p.19-24, 1998.

SOUTHAM, E.; PEREIRA, R.; STRATTON, S.C.; SARGENT, R.; FORD, A.J.; BUTTERFIELD, L.J.; WHEABLE, J.D.; BECKETT, S.R.G.; ROE, C.; MARSDEN, C.A.; HAGAN, R.M. Effect of lamotrigine on the activities of monoamine oxidases A and B in vitro and on monoamine disposition in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v.519, n.3, p.237-245, 2005.

SWANSON, C.J.; BURES, M.; JOHNSON, M.P.; LINDEN, A-M.; MONN, J.A.; SCHOEPP, D.D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.131-145, 2005.

TRINGALI, G.; AUBRY, J.M.; NAVARRA, P.; POZZOLI, G. Lamotrigine inhibits basal and Na⁺-stimulated, but not Ca²⁺-stimulated, release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus. **Psychopharmacology**, v.188, p.386-392, 2006.

WINSKY, L.; BRADY, L. Perspective on the status of preclinical models for psychiatric disorders. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v.2, n.4, p.279-283, 2005.

VINOD, K.Y.; SUBHASH, M.N. Lamotrigine induced selective changes in 5-HT_{1A} receptor mediated response in rat brain. **Neurochemistry International**, v.40, p.315-319, 2002.

ZARATE JR, C.A.; SINGH, J.B.; CARLSON, P.J.; MANJI, H.K. Molecular mechanism of bipolar disorder. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v.2, n.4, p.435-445, 2005.