

**ROL DE ADENOSINA EN EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DEL TRASTORNO BIPOLAR****VEGETTI MARIELA, DE LORENZO SILVANA, LOSAVIO ADRIANA, MUCHNIK SALOMÓN***Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari"*

Premio Sociedad Neurología Argentina otorgado en el XLI Congreso Argentino de Neurología, Tucumán, Octubre 2004

**Resumen** *Rol de adenosina en el diagnóstico temprano del trastorno bipolar.* En trabajos previos encontramos que el suero de pacientes bipolares contiene una sustancia que, cuando es transferida pasivamente a ratones CF1, disminuye la liberación espontánea del neurotransmisor y ocluye el efecto inhibitorio de CCPA (agonista específico del receptor A1) en sinapsis neuromuscular. Esta acción no fue observada con el suero de pacientes esquizofrénicos, permitiendo realizar un diagnóstico diferencial entre ambas enfermedades. Para conocer la naturaleza de la sustancia activa, el suero de pacientes bipolares fue filtrado (cut off 3000) obteniéndose dos fracciones. La frecuencia de MEPP (fMEPP) registrada de diafragmas de ratones inyectados con la fracción de suero de alto PM (APM) estuvo dentro del rango control, mientras que la inyección con la fracción de suero de bajo PM (BPM) indujo una disminución de la fMEPP, y no permitió que CCPA ejerciera su efecto inhibitorio; esas acciones fueron similares a las producidas por el suero entero de pacientes bipolares. Debido a que el trastorno bipolar es una enfermedad asociada a la hiperactividad neuronal que implica un aumento de la secreción de neurotransmisor y ATP, evaluamos si la adenosina (metabolito activo del ATP), estaba involucrada en los resultados observados. Para ello estudiamos el efecto de la fracción de BPM + adenosina deaminasa (ADA, enzima que degrada adenosina a su metabolito inactivo inosina). Este procedimiento abolió la acción observada con la fracción de BPM sin ADA. Conclusiones: Estos resultados sugieren que la sustancia del suero de pacientes bipolares que induce disminución de la liberación espontánea de ACh en unión neuromuscular cuando es transferida pasivamente a los ratones, es compatible con adenosina (PM: 267.2). Esto fue demostrado por el hecho que los efectos biológicos no fueron observados cuando la fracción de BPM fue tratada con ADA. Por otro lado, se puede descartar que la sustancia involucrada sea una inmunoglobulina ya que estas tienen un PM mayor a 3000. La modulación observada con la fracción de BPM puede ser explicada por el incremento de la concentración de adenosina en el espacio sináptico como consecuencia de la hiperactividad neuronal. Este mecanismo no estaría involucrado en la esquizofrenia; por lo tanto, este estudio constituye una nueva herramienta diagnóstica para diferenciar el trastorno bipolar de la esquizofrenia.

**Palabras claves:** trastorno bipolar, esquizofrenia, diagnóstico diferencial, adenosina, hiperactividad neuronal

**Summary** *Role of adenosine in the early diagnosis of bipolar disorder.* In a previous paper we found that the serum from bipolar patients (BP) contains a substance that when passively transferred to CF1 mice reduces spontaneous neurotransmitter secretion and occludes the inhibitory effect of CCPA (specific adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist) at neuromuscular synapses. This action was not observed with serum from schizophrenic patients, allowing to make a differential diagnosis between both diseases. To know the nature of the active substance, sera from BP were filtered (cut off 3000) obtaining two fractions. MEPP frequency (MEPPf) recorded from diaphragm of mice injected with high MW fraction sera (HMWFS) was within control range, while the injection of low MW fraction sera (LMWFS) induced a decrease of MEPPf, and a lack of action of CCPA; these actions were similar to those produced by the bipolar entire sera. Since bipolar disease is thought to be associated to neuronal hyperactivity, implicating an increase of neurotransmitter and ATP secretion, we evaluated whether adenosine (active metabolite of ATP) was involved in the observed results. Thus, we studied the effect of LMWFS+adenosine deaminase (ADA, enzyme that degrades adenosine into the inactive metabolite inosine). This procedure abolished the actions observed with LMWFS without ADA. Conclusions: These results suggest that the substance from BP sera that induces decrease of spontaneous ACh secretion at neuromuscular junctions when passively injected to mice, is compatible with adenosine (MW: 267.2). It was demonstrated when biological effects were not observed when LMWFS were treated with ADA. The substance is hardly an immunoglobulin because they have MW over 3000. Modulation observed with LMWFS could be explained by the increment of adenosine concentration in the synaptic space following the neuronal hyperactivity. This mechanism would not be involved in schizophrenia; thus, this study constitute a novel diagnostic tool to differentiate between bipolar and schizophrenic patients.

**Key words:** bipolar disorder, schizophrenia, differential diagnostic, adenosine, neuronal hyperactivity

## Introducción

El Trastorno Bipolar es una enfermedad psiquiátrica severa y crónica que afecta entre 2 y 6% de la población (Angst, J. et al 2003, Judd and Akiskal 2003, Szádóczy, E, et al 1998). Actualmente existen muchos factores que interfieren con el diagnóstico de esta enfermedad, como el amplio rango de manifestaciones clínicas, comorbilidad (especialmente alcoholismo y abuso de sustancias) y la edad de aparición. Además varios aspectos epidemiológicos, incluyendo susceptibilidad genética, riesgo de vida, edad de aparición y el curso de la enfermedad frecuentemente se enmascaran con otras enfermedades psiquiátricas tales como la esquizofrenia y desórdenes de la personalidad (Berrettini 2000). La aparición del Trastorno Bipolar habitualmente ocurre antes de los 25 años de edad, aunque recientes estudios han mostrado que el tratamiento de la enfermedad no empieza hasta 10 años después de su comienzo (Lish et al 1994, Hantouche et al 2003) lo que refleja las dificultades diagnósticas. La identificación y diagnóstico temprano de las diferentes formas del Trastorno Bipolar son de primordial importancia para implementar tratamientos específicos que llevarán a un mejor pronóstico.

Muchos investigadores sugieren que los síntomas del Trastorno Bipolar son causados por hiperactividad de ciertos circuitos neurales asociada con un aumento de la secreción del neurotransmisor (Bohus et al 1996, van Calker et al 1993). Se sabe que la adenosina es un nucleósido que es capaz de modular la liberación del neurotransmisor cuando se une a sus receptores presinápticos. La adenosina es un constituyente fisiológico de todos los fluidos corporales incluyendo al espacio extracelular. En la grieta sináptica la concentración de adenosina es muy cercana a su concentración intracelular debido a la presencia de transportadores específicos. Además puede formarse extracelularmente a partir del ATP que es co-liberado junto al neurotransmisor y luego hidrolizado a adenosina vía una cascada de ectonucleótidasas (Ver Revisión Fredholm, 1995). En el cerebro la activación de los receptores inhibitorios A1 probablemente tenga una importante función adaptativa como consecuencia de una actividad neuronal patológicamente exagerada tal cual puede ser el Trastorno Bipolar.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha caracterizado el efecto de adenosina en sinapsis neuromuscular de mamífero. La adenosina y el agonista específico del receptor A1 (CCPA) inducen inhibición presináptica de la liberación espontánea de ACh debido a la modulación de los canales de calcio voltaje dependientes (VDCC) tipo L. Por otro lado, demostramos que cuando la liberación espontánea es aumentada al exponer las terminales nerviosas a una alta concentración de  $K^+$  la adenosina endógena

(producto de la degradación del ATP liberado) induce inhibición presináptica al modular a los VDCC tipo P/Q como una manera de prevenir la excesiva liberación del neurotransmisor (De Lorenzo et al 2004).

Anteriormente demostramos que los pacientes bipolares contienen en su sangre una sustancia activa que transferida pasivamente a ratones modifica la liberación espontánea del neurotransmisor en sinapsis neuromuscular de músculo diafragma. De hecho, el suero proveniente de pacientes bipolares descompensados (curando un episodio maníaco o depresivo) induce una disminución significativa en la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPP) y ocluye el efecto inhibitorio de CCPA. El suero de pacientes bipolares eutímicos no altera la fMEPP pero previene la acción moduladora de CCPA. Estos resultados no se observan con suero de pacientes esquizofrénicos siendo por lo tanto una herramienta útil para diferenciar ambas enfermedades (Figura 1).

El objetivo de nuestro trabajo fue investigar la naturaleza de la sustancia presente en el suero de los pacientes bipolares que está vinculada a los cambios en la actividad presináptica.

## Materiales y métodos

*Recolección de sueros:* Las muestras de sueros fueron obtenidas de Pacientes Bipolares y voluntarios sanos. En todos los casos los sueros fueron congelados a  $-20^{\circ}C$  y almacenados hasta su utilización. El diagnóstico psiquiátrico de

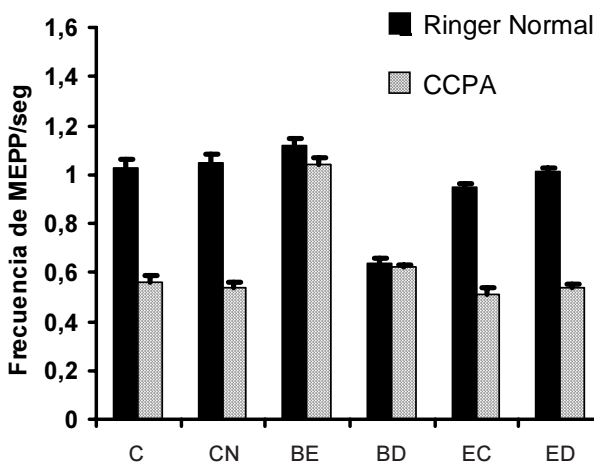


Fig. 1.— Efecto de la transferencia pasiva del suero de sujetos normales, pacientes bipolares y esquizofrénicos sobre la frecuencia de los MEPPs registrados en hemidiafragmas de los ratones receptores en presencia de Ringer-Krebs normal y CCPA. Las barras representan media  $\pm$  ESM. C: Ratones controles no inyectados; CN: Ratones inyectados con suero de sujetos normales, BE: Ratones inyectados con suero de pacientes bipolares eutímicos, BD: Ratones inyectados con suero de pacientes bipolares descompensados, EC: Ratones inyectados con suero de pacientes esquizofrénicos compensados, ED: Ratones inyectados con suero de pacientes esquizofrénicos descompensados.

los pacientes bipolares eutímicos y descompensados fue realizado por un psiquiatra idóneo utilizando el criterio DSM IV. Los pacientes bipolares consistieron en: 6 hombres y 5 mujeres, en un rango de edad desde 25 a 67 años. Las muestras controles fueron recolectadas de 6 hombres y 6 mujeres (rango de edad desde 29 a 50 años) que no tenían antecedentes de enfermedades psiquiátricas ni neurológicas

**Filtrado de suero y transferencia pasiva:** Con el objeto de establecer una relación entre los efectos biológicos observados en los ratones receptores y sustancias de diferente peso molecular, los sueros de pacientes bipolares eutímicos y descompensados fueron filtrados (2 ml/muestra) a través de un filtro *Centrifugal filter Devices Centricon YM-3, cut off 3000*. Luego la fracción de alto PM y bajo PM del suero de los pacientes eutímicos y descompensados fueron inyectados i.p. a ratones CF1 y a las 24 horas de la transferencia pasiva los animales fueron anestesiados con Tiopental sódico (50mg/Kg) y el hemidiafragma izquierdo fue disecado para el registro electrofisiológico.

**Estudios electrofisiológicos:** Los músculos fueron transferidos a una cámara de 5 ml perfundida con una solución Ringer-Krebs (mM: NaCl 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, D-glucose 11, HEPES 5, pH 7.3-7.4, burbujeada con O<sub>2</sub>). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20-23°C) utilizando técnicas convencionales de registro intracelular. En cada grupo experimental, la fMEPP fue registrada durante 100 s en al menos 10 uniones neuro-musculares diferentes, utilizando microelectrodos de vidrio llenos con CIK 3M y con una resistencia de 5 -10 MW. Después del registro de MEPPs en Solución Ringer-Krebs, investigamos la acción del agonista específico de los receptores A1 2-chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyl-adenosine (CCPA, Sigma, 500 nM). El suero de algunos pacientes bipolares fue pretratado (antes de la inyección ip al ratón) con adenosina deaminasa (ADA, Sigma, 0.5 U/ml), enzima que degrada a la adenosina a su metabolito inactivo inosina.

**Análisis estadístico:** los resultados fueron expresados como la media ± SEM y n representa el número de animales (sólo fue usado el hemidiafragma izquierdo de cada ratón por experimento). Las diferencias significativas entre cada media fue evaluada por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por el Test de Tuckey, las diferencias fueron consideradas significativas con p<0.05.

**Resultados**

*Efecto de la transferencia pasiva de fracciones de alto y bajo PM de sueros de pacientes bipolares sobre la fMEPP*

Con el propósito de conocer la naturaleza de la sustancia responsable de los cambios observados sobre la fMEPPs en los músculos diafragma de los ratones inyectados con suero de pacientes bipolares eutímicos y descompensados (ver Introducción), los sueros de ambos grupos de pacientes fueron sometidos a un filtrado con un cut off de 3000, obteniéndose dos fracciones: una con un PM mayor a 3000 (alto PM) y otra con un PM menor a 3000 (bajo PM). Dichas fracciones fueron luego transferidas a ratones. Los valores de fMEPP, registra-

dos de preparaciones pertenecientes a ratones inyectados con la fracción de alto PM de pacientes bipolares eutímicos y descompensados, estaban dentro de los valores controles (BP eutímicos 0.99 ± 0.03 MEPPs/seg, n= 6, BP descompensados 1.1 ± 0.02 MEPPs/seg, n= 5) y disminuyeron a 0.51 ± 0.04 MEPPs/seg (BP eutímicos) y 0.59 ± 0.01 MEPPs/seg, n= 5 (BP descompensados) cuando los músculos fueron incubados con CCPA (Figura 2). La fMEPP registrada en ratones inyectados con la fracción de bajo PM de pacientes bipolares eutímicos estaba dentro de valores controles (0.96 ± 0.03 MEPPs/seg, n= 6); sin embargo la fMEPPs no se modificó significativamente cuando las preparaciones fueron in-

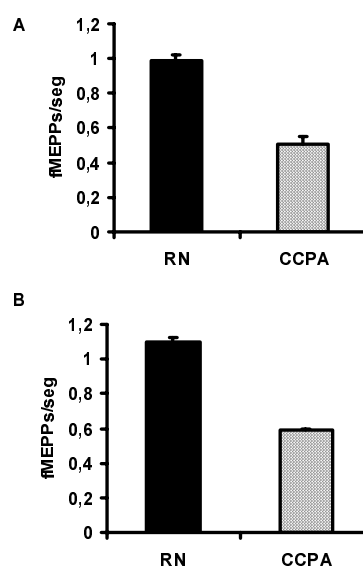


Fig. 2.- Efecto de la transferencia pasiva de la fracción de alto PM del suero de pacientes bipolares eutímicos (A) y descompensados (B) sobre la frecuencia de los MEPPs registrados en hemidiafragmas de los ratones receptores en presencia de Ringer-Krebs normal y CCPA. Las barras representan media ± ESM.

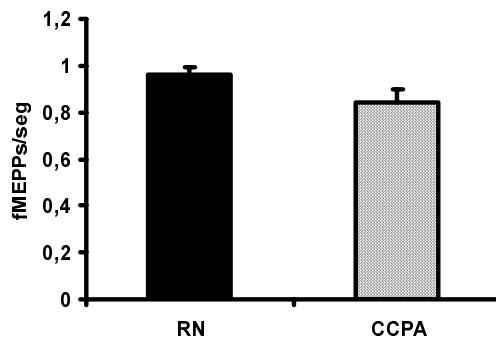


Fig. 3.- Efecto de la transferencia pasiva de la fracción de bajo PM del suero de pacientes bipolares eutímicos sobre la frecuencia de los MEPPs registrados en hemidiafragmas de los ratones receptores en presencia de Ringer-Krebs normal y CCPA. Las barras representan media ± ESM.

cubadas con CCPA ( $0.84 \pm 0.06$  MEPPs/seg, Figura 3). Por otro lado, la fracción de bajo PM de pacientes bipolares descompensados disminuyó la fMEPP ( $0.62 \pm 0.02$  MEPPs/seg,  $n=5$ ) y ocluyó la acción inhibitoria de CCPA ( $0.61 \pm 0.04$  MEPPs/seg, Figura 4). Los resultados observados con la inyección de la fracción de bajo PM de pacientes bipolares eutímicos y descompensados fueron similares a los observados con los sueros enteros; estos hallazgos tienen especial relevancia, ya que tanto la evaluación de la fMEPP obtenida con las fracciones de los sueros como con los sueros enteros provienen de los mismos pacientes.

#### *Efecto de ADA sobre el suero de pacientes bipolares.*

Posteriormente enfatizamos nuestro análisis en la fracción de bajo PM obtenida del suero de pacientes bipolares que presentó efectos biológicos sobre la fMEPP. Para examinar la posibilidad que la sustancia presente en dicha fracción fuera adenosina pretratamos la fracción de bajo PM del suero de los pacientes bipolares con ADA, la enzima que inactiva a la adenosina endógena convirtiéndola en inosina. Previamente, para evaluar el efecto de ADA sobre la adenosina en nuestro sistema experimental, estudiamos su efecto en ratones inyectados con 100 mM adenosina. La fMEPP registrada de preparaciones de animales inyectados solo con adenosina disminuyó a  $0.73 \pm 0.03$  MEPPs/seg,  $n=7$  comparado con el grupo control ( $1.03 \pm 0.03$  MEPPs/seg), mientras que los ratones inyectados con adenosina + ADA (0.5 U/ml) mostraron valores similares a los controles ( $1.03 \pm 0.03$  MEPPs/seg,  $n=6$ ), demostrando que la concentración de ADA era la adecuada para inactivar adenosina. Luego estudiamos el efecto de ADA sobre la fracción de bajo PM del suero de pacientes bipolares descompensados. Como se muestra en la Figura 5, la inyección de la frac-

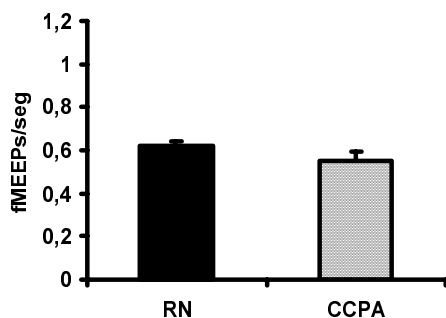


Fig. 4.- Efecto de la transferencia pasiva de la fracción de bajo PM del suero de pacientes bipolares descompensados sobre la frecuencia de los MEPPs registrados en hemidiafragmas de los ratones receptores en presencia de Ringer-Krebs normal y CCPA. Las barras representan media  $\pm$  ESM.

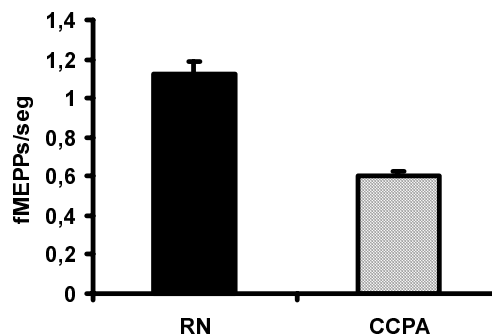


Fig. 5.- Efecto de la transferencia pasiva de la fracción de bajo PM del suero de pacientes bipolares descompensados + adenosina deaminasa (ADA) sobre la frecuencia de los MEPPs registrados en hemidiafragmas de los ratones receptores en presencia de Ringer-Krebs normal y CCPA. Las barras representan media  $\pm$  ESM.

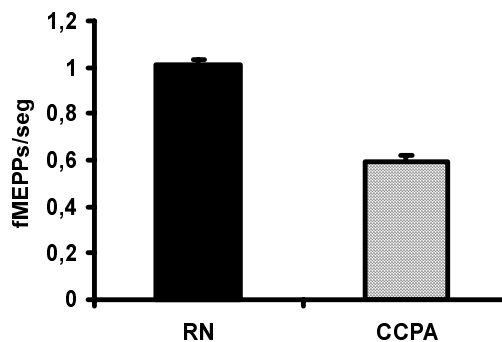


Fig. 6.- Efecto de la transferencia pasiva de la fracción de bajo PM del suero de pacientes bipolares eutímicos + adenosina deaminasa (ADA) sobre la frecuencia de los MEPPs registrados en hemidiafragmas de los ratones receptores en presencia de Ringer-Krebs normal y CCPA. Las barras representan media  $\pm$  ESM.

ción de bajo PM + ADA a los ratones, previno la disminución de la fMEPPs y la oclusión del efecto de CCPA observados con las fracciones de bajo PM de los sueros de pacientes bipolares descompensados no tratados con ADA. En efecto, las fracciones tratadas con ADA mostraron una fMEPP dentro de los valores controles ( $1.01 \pm 0.02$  MEPPs/seg,  $n=5$ ) y CCPA pudo ejercer su típica inhibición presináptica sobre la liberación espontánea ( $0.59 \pm 0.03$  MEPPs/seg). También observamos que la fracción de bajo PM del suero de pacientes bipolares eutímicos tratado con ADA permitió la acción de CCPA ( $0.61 \pm 0.03$  MEPPs/seg,  $n=6$ , Figura 6).

## Discusión

La hiperactividad de ciertas vías neurales presumiblemente provoca algunos de los síntomas del Tras-

torno Bipolar, y un aumento en la sensibilización de ciertos circuitos neurales sería la causa del aumento en la frecuencia y severidad de los episodios, los que ocurren durante el curso de la enfermedad (Post, 1992). Además, el uso de anticonvulsivantes como estabilizadores del humor en el tratamiento del trastorno bipolar parece estar relacionado a una reducción de la excesiva liberación del neurotransmisor en el cerebro, regulando de esta manera la señalización intracelular alterada en regiones críticas del sistema límbico (Xie and Hagan 1998). Existen evidencias en cuanto a las implicancias de la proteína G y sistemas de segundos mensajeros en la fisiopatología del Trastorno Bipolar. Se ha encontrado que en corteza frontal de cerebro de pacientes con trastorno bipolar la actividad de protein kinasa C asociada a membrana está aumentada (Wang and Friedman 1996). Estudios en cerebros post mortem de pacientes bipolares revelaron niveles aumentados de  $G_{\alpha s}$  (Friedman and Wang 1996, Young et al 1993) y un aumento en AMP $_c$  y actividad de PKA en estos pacientes (Fields et al 1999, Perez et al 2000). El aumento en la actividad de PKC y/o PKA en los pacientes con trastorno bipolar puede inducir una liberación exagerada del neurotransmisor en diferentes circuitos neurales. En unión neuromuscular de ratón, tanto PMA (activador de PKC) y forskolina (activador de PKA) inducen un aumento en la liberación del neurotransmisor ACh vía un mecanismo independiente del influjo de calcio en la terminal nerviosa (Scornik et al 1990, Losavio and Muchnik 2000, De Lorenzo et al 2004).

La transmisión sináptica está sujeta a una variedad de influencias moduladoras que pueden modificar la probabilidad de liberación del neurotransmisor. A altos niveles de neurosecreción, el ATP coliberado junto con el neurotransmisor, induce inhibición presináptica vía su metabolito activo adenosina. Nosotros hemos demostrado recientemente que, cuando la liberación espontánea está aumentada al exponer las terminales nerviosas a altas concentraciones de  $K^+$ , la adenosina endógena, al ocupar sus receptores A1, induce inhibición presináptica como una manera de prevenir la excesiva liberación del neurotransmisor. En esas condiciones experimentales el efecto del agonista específico del receptor A1 CCPA no puede evidenciarse (De Lorenzo et al 2004).

Nuestros resultados demuestran que los pacientes bipolares contienen en su sangre una sustancia activa que transferida pasivamente a ratones modifica la liberación espontánea del neurotransmisor en sinapsis neuromusculares (ver Introducción). Una posibilidad es que los pacientes bipolares tengan ciertos circuitos neurales hiperactivos que induzcan un aumento de la concentración de adenosina en el espacio sináptico y por ende en la sangre de dichos pacientes. Para evaluar esta hipótesis los sueros de los pacientes bipolares fueron filtrados (cut-off 3000) obteniéndose dos fracciones que fueron transferidas a los ratones. La fMEPP regis-

trada en los hemidiafragmas de ratones inyectados con la fracción de alto PM del suero de pacientes bipolares eutímicos y descompensados, no mostró diferencias con el grupo control. Contrariamente, la inyección de la fracción de bajo PM del suero de pacientes bipolares descompensados indujo una disminución de la fMEPP, no observándose el típico efecto inhibitorio inducido por CCPA, mientras que la inyección de la fracción de bajo PM de pacientes bipolares eutímicos no modificó la liberación espontánea de ACh cuando los hemidiafragmas fueron incubados con Ringer Normal, pero CCPA tampoco pudo ejercer su acción inhibitoria. Los efectos observados con la fracción de suero de bajo PM, tanto de pacientes bipolares eutímicos como descompensados, fueron similares a las producidas con el suero entero de esos mismos pacientes, sugiriendo que la sustancia biológicamente activa tiene un PM menor a 3000, descartándose por lo tanto que la misma pudiese ser una inmunoglobulina. La adenosina tiene un PM de 267.2 y para verificar si este nucleósido es el responsable de nuestros resultados, en otro grupo de experimentos, previamente a la inyección de la fracción de bajo PM a los ratones, expusimos dicha fracción a ADA, la enzima que degrada adenosina a su metabolito inactivo inosina. Este procedimiento abolió la acción observada con la fracción de suero de bajo PM sin ADA, sugiriendo que existe una relación entre los cambios observados en la fMEPP de los ratones inyectados con la fracción de bajo PM del suero de los pacientes bipolares y adenosina.

Estos resultados nos permiten concluir que el suero de los pacientes bipolares contiene una sustancia que transferida pasivamente a ratones induce cambios en la liberación espontánea del neurotransmisor en sinapsis neuromusculares. Tal sustancia sería compatible con adenosina, ya que la misma indujo una inhibición presináptica de aproximadamente 45% al activar los receptores A1 de adenosina presentes en las terminales nerviosas del músculo diafragma de los ratones receptores luego que éstos fueran inyectados con suero entero o con la fracción de bajo PM del suero de los pacientes bipolares descompensados. Más aún, la ocupación de los receptores A1 por adenosina impidió la acción de CCPA (agonista de los receptores A1). Por otro lado, estos efectos no pudieron observarse cuando las fracciones de bajo PM fueron tratadas con la enzima que degrada a la adenosina. Los sueros de pacientes bipolares eutímicos indujeron cambios de menor magnitud. El probable aumento de la concentración de adenosina en el suero de los pacientes bipolares reflejaría un incremento de la liberación del neurotransmisor y por ende de ATP (fuente de adenosina) como consecuencia de la hiperactividad de ciertos circuitos neuronales. Este mecanismo no estaría involucrado en la esquizofrenia, ya que la inyección de suero de estos pacientes a ratones no produjo modificaciones en la

neurotransmisión. Por lo tanto, este estudio constituye una nueva herramienta diagnóstica para poder distinguir entre enfermedad bipolar y esquizofrenia, permitiendo implementar terapéuticas específicas tempranas que puedan mejorar el pronóstico de ambas entidades.

## Referencias

- Angst J, Gamma A, Benazzi F, Ajdacic V, Eich D. and Rossler W. (2003). Toward a re-definition of subthreshold bipolarity: epidemiology and proposed criteria for bipolar-II, minor bipolar disorders and hypomania. *J. Affect. Disord.* 73: 133-146.
- Berrettini WH. (2000). Susceptibility loci for bipolar disorder: overlap with inherited vulnerability to schizophrenia. *Biol Psychiatry* 47: 245-251.
- Bohus M, Förstner U, Kiefer Ch, Gebicke-Härter P, Timmer J, Spraul G, Wark H, Hecht H, Berger M. and van Calker D. (1996). Increased sensitivity of the inositol-phospholipid system in neutrophils from patients with acute major depressive episodes. *Psychiatry Research* 65: 45-51.
- De Lorenzo S., Veggetti M., Muchnik S. and Losavio A. (2004). Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release induced by adenosine at the mouse neuromuscular junction. *British Journal of Pharmacology* 142: 113-124.
- Fields A, Li O, Kish SJ. and Warsh JJ. (1999). Increased cyclic AMP-dependent protein kinase activity in postmortem brain from patients with bipolar affective disorder. *J. Neurochem.* 73: 1704-1710.
- Fredholm BB. (1995). Adenosine receptors in the central nervous system. *NIPS*, 10: 122-128.
- Friedman E. and Wang HY. (1996). Receptor-mediated activation of G proteins is increased in postmortem brains of bipolar affective disorder subjects. *J. Neurochem.* 67: 1145-1152.
- Hantouche EG, Azorin JM, Chatenet-Duchene L, Lancrenon S, Allilaire JF and Akiskal HS. (2003). Caracterisation de la manie dans une cohorte nationale de 1090 patients dans "EPI-MAN-II Mille": fréquence des sous-types cliniques, debut et errances diagnostiques. *Ann. Méd. Psicol.* 161: 359-366.
- Judd LL and Akiskal HS (2003) The prevalence and disability of bipolar spectrum disorders in the U.S. population: re-analysis of the ECA database taking into account subthreshold cases. *J. Affect. Disord.* 73: 123-131.
- Lish J, Dime-Meman S, Whydrow, PC, Prince RA and Hirschfeld RMA. (1994). The national depressive and manic-depressive association survey of bipolar members. *Journal of Affective Disorders* 31: 281-294.
- Losavio A and Muchnik S. (2000). Facilitation of spontaneous acetylcholine release induced by activation of cAMP in rat neuromuscular junctions. *Life Sci.* 66 (26): 2543-56.
- Perez J, Tardito, D, Mori S, Racagni G, Smeraldi E and Zanardi R. (2000) Altered rap 1 endogenous phosphorylation and levels in platelets from patients with bipolar disorders. *J. Psychiatric Res* 34: 99-104.
- Post RM (1992). The transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am. J. Psychiatry* 149: 999-1010.
- Scornik F, Szczupak L, Nicola Siri L and Uchitel OD. (1990). Ca<sup>2+</sup> role on the effect of phorbol esters on the spontaneous quantal release of neurotransmitter at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res.* 525, 280-284.
- Szádóczy E, Papp Z, Vitrai J, Rihmer Z and Furedi J. (1998). The prevalence of major depressive and bipolar disorders in Hungary: Results from a national epidemiological survey. *Journal of Affective Disorders* 50, 153-162.
- van Calker D, Forstner U, Bohus M, Gebicke-Harter P, Hecht H, Wark HJ and Berger M. (1993). Increased sensitivity to agonist stimulation of the Ca<sup>2+</sup> response in neutrophils of manic-depressive patients: effect of lithium therapy. *Neuropsychobiology* 27(3):180-3.
- Wang H-Y and Friedman E. (1996). Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorder brains. *Biol Psychiatry* 40: 568-575.
- Xie X and Hagan RM. (1998). Cellular and molecular actions of lamotrigina: Possible mechanism of efficacy in Bipolar disorder. *Neuropsychobiology.* 38: 119-130.
- Young L, Li P, Kish SJ, Siu KP, Kamble A, Hornykiewicz O and Warsh JJ. (1993). Cerebral cortex Gs alpha protein levels and forskolin-stimulated cyclic AMP formation are increased in bipolar affective disorder. *J. Neurochem.* 61: 890-898.