RAFAEL TEIXEIRA DE SOUSA

**Fisiopatologia do Transtorno de Humor Bipolar e efeito do
tratamento com lítio: enfoque em neuroproteção e função
mitocondrial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Machado-Vieira

São Paulo

- 2014 -

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Rafael Teixeira de

Fisiopatologia do Transtorno de Humor Bipolar e efeito do tratamento com lítio :
enfoque em neuroproteção e função mitocondrial / Rafael Teixeira de Sousa. -- São
Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Psiquiatria.

Orientador: Rodrigo Machado-Vieira.

Descritores: 1.Transtorno bipolar 2.Mitocôndrias 3.Lítio 4.Estresse oxidativo
5.Complexo de proteínas da cadeia de transporte de elétrons 6.Ciclo do ácido cítrico
7.DNA mitocondrial 8.Óxido nítrico 9.Efeito neuroprotetor

USP/FM/DBD-042/14

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, que representam a minha origem e foram a minha grande influência nas minhas escolhas.

Dedico também esta tese à minha irmã e ao meu irmão, com quem dividi a maior parte da minha vida.

Dedico a tese ao meu cunhado, que já é um irmão.

E por fim, dedico a tese aos amigos que dividiram tanto tempo comigo que já são da minha família.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais por tudo o que fizeram por mim e, em especial, pelos valores que me inculcaram; sem estes valores eu não teria ganas de almejar a mais na minha vida.

Agradeço também aos meus irmãos e ao meu cunhado pelo companheirismo e apoio, que são a base para que se possa lutar.

Agradeço muito ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Machado-Vieira por ter sido amigo e por ter sido duro comigo, tentando tirar de mim o melhor.

Agradeço ao Prof. Wagner F. Gattaz por proporcionar um ambiente de alto nível científico no LIM27, por apoiar o meu projeto, confiar no meu trabalho e por todo o auxílio que me deu.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcus Zanetti pelo suporte científico que me deu inúmeras vezes, sendo quase um coorientador.

Agradeço a toda a equipe do LIM27 pela amizade, pelo companheirismo e pelo trabalho eficiente, que permitiu a execução do meu projeto.

Agradeço à Profa. Dra. Elisa Higa e à equipe do Laboratório de Óxido Nítrico da Unifesp pela frutuosa colaboração.

Agradeço ao Prof. Dr. Emílio Streck e à equipe do Laboratório de Bioenergética da Unesc pelo produtivo trabalho juntos.

Agradeço à Profa. Dra. Suely K. N. Marie e aos colegas do LIM15 pelo profícuo trabalho em conjunto.

Agradeço ao Prof. Dr. Geraldo Busatto e à equipe do LIM21, que trabalhou conosco com grande companheirismo e eficácia.

Agradeço à Fapesp pelo auxílio que financiou o projeto e suas dosagens.

Agradeço à Universidade de São Paulo e ao Departamento de Psiquiatria da FMUSP pelo apoio na divulgação dos meus resultados.

Agradeço a tantas pessoas que não vou poder citar aqui textualmente, mas que fizeram muita diferença com seus conselhos, com o seu apoio e com os horizontes que me descortinaram. Ainda que de forma indireta, esta ajuda foi certamente decisiva para que conseguisse concluir o meu trabalho.

*Privados de um trabalho significativo, homens e
mulheres perdem a sua razão para existir*

Dostoievski

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A mitocôndria	2
1.2. Função mitocondrial no THB	8
1.3. Alterações de metabolismo energético em estudos de neuroimagem no THB	9
1.4. Estresse oxidativo no THB	12
1.5. O estresse oxidativo está associado a alterações em neurotransmissores no THB ..	15
1.6. Associação do THB com genes mitocondriais e sua expressão diferencial no transtorno	16
2. JUSTIFICATIVA	19
2.1. Neuropressão no THB e a investigação de biomarcadores	19
2.2. Subtipo e fase no THB	21
3. OBJETIVOS E HIPÓTESES	22
3.1. Objetivos gerais	22
3.2. Objetivos específicos	22

3.3. Hipóteses	23
4. MÉTODOS	26
4.1. Seleção da amostra.....	26
4.2. Desenho do estudo.....	27
4.3. Análises laboratoriais	28
4.3.1. Colaborações e participação do candidato ao doutoramento em ensaios	28
4.3.2. Dados específicos dos ensaios laboratoriais	29
4.3.3. Atividade dos complexos I, II, II-III e IV e das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase	30
4.3.4. Atividade das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase.....	31
4.3.5. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo	32
4.3.6. Avaliação do conteúdo de DNAm	34
4.4. Análise estatística de dados demográficos e clínicos.....	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Descrição da amostra e dados clínicos	37
5.2. Resultados publicados	39
5.3. Resultados submetidos.....	40
5.4. Resultado a ser submetido: Atividade das Enzimas do Ciclo do Ácido cítrico no THB e o Efeito do Tratamento com Lítio	41
5.4.1. Justificativa	41
5.4.2. Análise estatística.....	42
5.4.3. Resultados	42
5.4.4. Discussão	45

6. ANÁLISE CRÍTICA DOS ACHADOS	47
6.1. Neurobiologia do THB.....	47
6.2. Efeito do tratamento com lítio	50
6.3. Limitações e pontos fortes	53
6.4. Conclusão e perspectivas	53
7. ANEXOS.....	55
7.1. Artigos publicados	55
7.1.1. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder	55
7.1.2. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium	60
7.2. Artigos submetidos.....	67
7.2.1. Lithium Increases Nitric Oxide Levels in Subjects with Bipolar Disorder during Depressive Episodes	67
7.2.2. Lithium Increases Leukocyte Mitochondrial Complex I in Short-Term Bipolar Disorder.....	82
8. REFERÊNCIAS.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da mitocôndria e a cadeia transportadora de elétrons: os complexos I-V são parte da membrana mitocondrial interna. O NADH e o FADH₂ doam elétrons para os complexos I e II, respectivamente. A cada passagem de elétrons de um transportador para o outro, há liberação de energia e é gerado um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. Através do complexo V os íons de hidrogênio passam de volta para a matriz, produzindo ATPs. Cada complexo compreende várias proteínas. (Adaptado: Clay et al., 2011).3

Figura 2. Via aeróbica e via anaeróbica de produção de energia. A via anaeróbica (de baixa produção energética) compreende a quebra de glicose em piruvato, que é transformado em lactato no citosol. Na via aeróbica (de alta produção energética) o piruvato derivado da glicose entra na mitocôndria, onde é transformado em acetil-coenzima A (acetil-CoA), que vai ser transformada em citrato pela enzima citrato sintase (CS). Em seguida a Acetil-CoA vai se converter em α -cetoglutarato e depois em succinil-coenzima A (succinil-coA) e então succinato. O succinato será transformado em fumarato pela succinato desidrogenase (SDH), tornando-se depois malato. O malato será mudado em oxaloacetato com o auxílio da malato desidrogenase (MDH).6

Figura 3. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é transformado em $H_2O + \frac{1}{2}O_2$ pela ação das enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O óxido nítrico (NO) é transformado em peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). $ONOO^{\cdot-}$ e H_2O_2 causam dano oxidativo, refletido na peroxidação lipídica com aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).14

Figura 4. Atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em pacientes com Transtorno de Humor Bipolar I (THB I) e THB II comparados com controles saudáveis. * $p < 0,05$44

Figura 5. Modelo neurobiológico proposto para o Transtorno de Humor Bipolar de início recente. A fase inicial do THB é marcada por mecanismos compensatórios como o aumento de atividade da catalase e da glutathione peroxidase, que diminuem o estresse oxidativo e preservam as atividades da cadeia transportadora de elétrons e das enzimas do ciclo do ácido cítrico e o número de mitocôndrias (indicado pelo conteúdo de DNA mitocondrial e pela atividade da citrato sintase).49

Figura 6. Modelo proposto para a ação neuroprotetora do lítio no Transtorno de Humor Bipolar (THB). O lítio aumenta a atividade da cadeia transportadora de elétrons e diminui a atividade da superóxido dismutase no THB, gerando assim diminuição do estresse oxidativo. O lítio também aumenta os níveis do neuromodulador óxido nítrico...51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes em episódio depressivo de Transtorno de Humor Bipolar (THB) e controles saudáveis.....38

Tabela 2. Atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em pacientes com depressão bipolar antes e depois do tratamento em comparação com controles saudáveis.....43

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

CAT - catalase

CGI - Impressão Clínica Global

DNAmt - DNA mitocondrial

DSM-IV - 4º Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

ERM - Espectroscopia por Ressonância Magnética

GPx - glutathione peroxidase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

NO - óxido nítrico

O²⁻ - radical superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

SCID - Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do DSM-IV

SOD - superóxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

THB - Transtorno de Humor Bipolar

RESUMO

de Sousa, R. T. *Fisiopatologia do Transtorno de Humor Bipolar e efeito do tratamento com lítio: enfoque em neuroproteção e função mitocondrial* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014

Introdução: Diversas evidências apontam para um papel da disfunção mitocondrial no Transtorno de Humor Bipolar (THB), mas pouco se sabe sobre isso no THB de início recente. Na mitocôndria a atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE) atua juntamente com o ciclo do ácido cítrico na produção de energia, mas não está claro se estão alteradas no THB. O DNA mitocondrial (DNAm) codifica diversas proteínas da CTE e está associado ao estresse oxidativo, mas nunca foi avaliado em pacientes no THB *in vivo*. O estresse oxidativo está associado ao THB e à disfunção mitocondrial, mas não se sabe muito das atividades das enzimas antioxidantes no THB de início recente. O óxido nítrico (NO) é uma molécula com efeitos neuromoduladores, mas com um papel no THB ainda não elucidado. O lítio é um tratamento padrão-ouro no THB, tendo mostrado efeitos neuroprotetores. Apesar disso, pouco se conhece do efeito do lítio na CTE, nas enzimas do ciclo do ácido cítrico, no conteúdo de DNAm e na regulação de NO em humanos. Também não está claro o papel antioxidante do lítio no THB. **Metódos:** Pacientes com THB em depressão (n=31), não medicados em sua maioria (84%), foram tratados por 6 semanas com lítio. Antes e depois do tratamento, verificaram-se em leucócitos as atividades dos complexos I-IV da CTE, atividades das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase e também o conteúdo de DNAm; em plasma foram analisados os níveis de NO, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e as atividades de catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e razão de SOD/CAT. Os pacientes com depressão bipolar foram comparados com 28 controles saudáveis. **Resultados:** Em comparação com controles, os pacientes com THB tiveram um aumento de GPx ($p<0,001$) e CAT ($p=0,005$) e uma diminuição de SOD/CAT ($p=0,001$), sem outras diferenças nos demais biomarcadores. Pacientes com THB I mostraram uma diminuição de citrato sintase ($p=0,02$) e uma discreta diminuição do conteúdo de DNAm ($p=0,05$) em comparação com o THB II; o conteúdo de DNAm esteve ligeiramente diminuído no THB I comparado com controles ($p=0,05$). Do início ao fim do tratamento com lítio houve aumento da atividade do complexo I da CTE ($p=0,02$), diminuição de TBARS ($p=0,02$) e SOD ($p=0,03$) e aumento de NO ($p=0,02$), sem haver alteração de outros parâmetros. Depois do tratamento, o TBARS se mostrou diminuído em respondedores comparados a não respondedores ($p=0,02$) e diminuído no THB II em comparação com o THB I ($p=0,04$). **Discussão:** No THB de início recente, houve poucas alterações em biomarcadores. Os achados sugerem aumento de CAT e GPx na depressão bipolar de início recente e uma diminuição de conteúdo mitocondrial no THB I comparado com o THB II, que devem ser confirmadas por outros estudos. Os resultados reforçam um papel neuroprotetor do lítio, sugerindo que a droga aumente a atividade do complexo I da CTE mitocondrial e aumente os níveis de NO na depressão bipolar. Além disso, o lítio reforçou o seu papel antioxidante e modulador das enzimas antioxidantes no THB.

Descritores: 1) Transtorno Bipolar 2) Mitocôndrias 3) Lítio 4) Estresse Oxidativo 5) Complexo de Proteínas da Cadeia de Transporte de Elétrons 6) Ciclo do Ácido Cítrico 7) DNA Mitocondrial 8) Óxido Nítrico 9) Fármacos Neuroprotetores

ABSTRACT

de Sousa, R. T. *Bipolar Disorder pathophysiology and the effect of lithium treatment: focus on neuroprotection and mitochondrial function* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014

Background: Several evidences point to a role for mitochondrial dysfunction in Bipolar Disorder (BD), but few is known about it on short-term BD. In mitochondria the electron transport chain (ETC) acts jointly with citric acid cycle to produce energy, but it is not clear if they are altered in BD. Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes several ETC proteins and is associated with oxidative stress, but it was never evaluated in BD *in vivo*. Oxidative stress is associated with BD and with mitochondrial dysfunction, but few is known about the activities of antioxidant enzymes in short-term BD. Nitric oxide (NO) is a molecule with neuromodulatory effects, but with an unclear role in BD. Lithium is a gold-standard treatment for BD, which has shown neuroprotective effects. However, few is known about lithium effect on ETC, citric acid cycle, mtDNA content, and NO regulation in humans. Also, lithium's antioxidant role in BD is unclear. **Methods:** Patients with BD depression (n=31) unmedicated in majority (84%) received lithium treatment for 6 weeks. Before and after treatment, in leukocytes the activities of ETC complex I-IV, citrate synthase, succinate dehydrogenase, and malate dehydrogenase, and mtDNA content were evaluated; in plasma, NO levels, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and superoxide dismutase (SOD), and SOD/CAT ratio were evaluated. Bipolar depression patients were compared with 28 healthy controls. **Results:** When compared with controls, BD patients showed an increase in GPx ($p<0.001$) and CAT ($p=0.005$) and a decrease in SOD/CAT ($p=0.001$), but showed no difference for other biomarkers. Patients with BD I showed a decrease in citrate synthase ($p=0.02$) and a slight decrease in mtDNA content ($p=0.05$) when compared to BD II; mtDNA content was slightly decreased in BD I compared to controls ($p=0.05$). From baseline to endpoint, there was an increase in ETC complex I activity ($p=0.02$), a decrease in TBARS ($p=0.02$) and SOD ($p=0.03$) and an increase in NO ($p=0.02$), without change in other parameters. After treatment, TBARS was decreased in responders compared to non-responders ($p=0.02$) and decreased in BD II compared to BD I ($p=0.04$). **Discussion:** In short-term BD few alterations were observed on biomarkers. The findings suggest increase on CAT and GPx in short-term bipolar depression and mitochondrial content decrease in BD I when compared to BD II, which deserve other studies for confirmation. The results reinforce a lithium's neuroprotective role and suggest that lithium increases ETC complex I activity and NO levels in bipolar depression. Moreover, lithium reinforced its role as antioxidant and as a modulator of antioxidant enzymes in BD.

Descriptors: 1) Bipolar Disorder 2) Mitochondria 3) Lithium 4) Oxidative stress 5) Electron Transport Chain Complex Proteins 6) Citric acid cycle 7) Mitochondrial DNA 8) Nitric Oxide 9) Neuroprotective Agents

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é um distúrbio mental grave e crônico, que muitas vezes põe em risco a vida dos acometidos. Apesar da sua gravidade e da sua incidência em cerca de 2% na população (Merikangas et al., 2007), os mecanismos fisiopatológicos que estão por trás da clínica estão longe de estar elucidados, o que limita o desenvolvimento de novos tratamentos.

Ainda que o THB não seja uma doença neurodegenerativa típica, diversos estudos têm mostrado associação do THB com estresse celular e morte de células da glia e neurônios (Machado-Vieira et al., 2009). Os achados em cérebros *post-mortem* no THB mostram diminuição volumétrica de áreas reguladoras do humor, como o córtex pré-frontal, o córtex cingulado anterior e a amígdala (Rajkowska et al., 2001). Ongur *et al.* (1998) encontraram uma diminuição de 41% de células da glia no córtex pré-frontal em pacientes com THB que tinham história familiar de transtornos de humor. Para alguns tipos específicos de neurônios analisados no THB, encontrou-se redução de densidade neuronal em córtex pré-frontal (Rajkowska et al., 2001) e em córtex cingulado anterior (Benes et al., 2001).

Os estudos de neuroimagem também corroboram estes achados, mostrando alterações de volume e estruturais em áreas relacionadas ao controle do humor no THB. Diversas alterações morfométricas foram descritas no THB, entre elas reduções de volume de córtex pré-frontal, cíngulo anterior, tálamo, núcleo caudado e putâmen, amígdala e hipocampo (Beyer & Krishnan, 2002; Sheline, 2003).

Em regiões importantes para a regulação de humor, observaram-se ainda alterações de níveis de N-acetil-aspartato, colina e mio-Inositol através de Espectroscopia por Ressonância Magnética (ERM) de prótons (Stork & Renshaw, 2005). Estes marcadores têm relação com

neurotrofismo (Clark, 1998; Govindaraju et al., 2000; Silverstone et al., 2005) e também estão ligados ao controle do metabolismo energético (Stork & Renshaw, 2005).

Na tentativa de compreender as alterações presentes no THB, inicialmente o foco das pesquisas foi a desregulação de neurotransmissores, porém logo passando a ser a sinalização intracelular (Hahn & Friedman, 1999; Gould & Manji, 2002); mais recentemente, o metabolismo energético mitocondrial, o estresse oxidativo e a neurogênese tem sido alvo do enfoque nos estudos em THB (Berk et al., 2011). Além disso, levantou-se a hipótese de que a perda de suporte neurotrófico, o estresse oxidativo e a inflamação estejam associados a estádios mais avançados do THB, ocorrendo progressivamente (Berk et al., 2013). Neste panorama, a função mitocondrial e a neuroproteção são particularmente relevantes no THB.

1.1. A mitocôndria

A mitocôndria é uma organela composta por uma membrana externa e uma interna, sendo o espaço entre ambas denominado espaço intermembranoso (Figura 1). Na parte interior existe a matriz mitocondrial, onde acontece o ciclo do ácido cítrico.

A mitocôndria é a única organela celular que contém DNA próprio, codificando 37 genes ligados à produção de RNAs transportadores, RNAs ribossomais e proteínas da cadeia transportadora de elétrons. Apesar disso, a maior parte das proteínas mitocondriais é codificada pelo DNA nuclear. O DNA mitocondrial (DNAm) é herdado quase exclusivamente da mãe, já que o gameta feminino contém muito mais citoplasma que o masculino. O padrão de herança materno encontrado por alguns estudos no THB (McMahon et al., 1995; Stine et al., 1995) é também uma evidência a favor do envolvimento da organela no transtorno.

Figura 1. Anatomia da mitocôndria e a cadeia transportadora de elétrons: os complexos I-V são parte da membrana mitocondrial interna. O NADH e o FADH₂ doam elétrons para os complexos I e II, respectivamente. A cada passagem de elétrons de um transportador para o outro, há liberação de energia e é gerado um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. Através do complexo V os íons de hidrogênio passam de volta para a matriz, produzindo ATPs. Cada complexo compreende várias proteínas. (Adaptado: Clay et al., 2011).

Outra característica particular da mitocôndria é a heteroplasmia. Células diferentes têm números e tipos diferentes de mitocôndrias. Daí a disfunção mitocondrial ser capaz de se manifestar de uma maneira muito específica ou regional (Quiroz et al., 2008), podendo, por exemplo, acometer só o sistema nervoso central. O DNAm tem variação do número de moléculas entre os diferentes tecidos (Clay Montier et al., 2009). O conteúdo de DNAm (medido pelo número de cópias de DNAm) é conhecido por refletir a estabilidade dos genes mitocondriais e o número de mitocôndrias (Malik & Czajka, 2013), que é essencial para o bom funcionamento celular (Clay Montier et al., 2009). Há evidência ligando a diminuição de conteúdo de DNAm à depressão (Kim et al., 2011) e à pior cognição em idosos (Lee et al., 2010), porém nenhum estudo avaliou o conteúdo de DNAm *in vivo* em pacientes com THB.

A mitocôndria tem função de conversão da energia de açúcares em ATPs. Tal processo se dá com o auxílio de enzimas do ciclo do ácido cítrico. Inicialmente acontece a glicólise, quebra de glicose em piruvato (Figura 2). Na via anaeróbica, a produção de piruvato dá origem ao lactato, produzindo pouca energia. Na via aeróbica, de grande produção energética, o piruvato derivado da glicose é transformado em acetil-coenzima A que entra no ciclo do ácido cítrico. Junto com o oxaloacetato, a acetil-coenzima A vai ser transformada em citrato pela enzima citrato sintase. Em seguida vai se converter em α -cetoglutarato e depois em succinil-coenzima A e então succinato. O succinato será transformado em fumarato pela succinato desidrogenase, tornando-se depois malato. O malato será mudado em oxaloacetato com o auxílio da malato desidrogenase. Apesar da relevância das enzimas do ciclo do ácido cítrico na produção de energia, nenhum estudo avaliou a atividade das enzimas em células periféricas no THB.

No ciclo do ácido cítrico são produzidos NADH₂ e FADH, que transferem elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. O NADH+H transfere seus elétrons para o complexo I da

cadeia transportadora de elétrons (ou cadeia respiratória) (Figura 1). Na matriz mitocondrial ocorre produção de succinato, que leva elétrons para o complexo II da cadeia. Os elétrons passam dos complexos I ou II para a coenzima Q, seguindo para o complexo III. Indo para o complexo IV, os elétrons se combinam com O_2 para produzir H_2O . A cada passagem de elétrons de um transportador para o outro, há liberação de energia e é gerado um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. Através do complexo V os íons de hidrogênio passam de volta para a matriz, produzindo ATPs.

Encontrou-se menor expressão de genes que codificavam proteínas relacionadas aos complexos I, III, IV e V em cérebros de pacientes com THB (Konradi et al., 2004; Sun et al., 2006). O achado indica acometimento da cadeia transportadora de elétrons, com provável impacto na produção de energia por ATPs. O lítio, por sua vez, aumentou a expressão do complexo I em cérebros de pacientes com THB (Sun et al., 2006), sugerindo assim uma ação neuroprotetora da droga através da melhora do metabolismo energético.

Figura 2. Via aeróbica e via anaeróbica de produção de energia. A via anaeróbica (de baixa produção energética) compreende a quebra de glicose em piruvato, que é transformado em lactato no citosol. Na via aeróbica (de alta produção energética) o piruvato derivado da glicose entra na mitocôndria, onde é transformado em acetil-coenzima A (acetil-CoA), que vai ser transformada em citrato pela enzima citrato sintase (CS). Em seguida a Acetil-CoA vai se converter em α -cetogluturato e depois em succinil-coenzima A (succinil-coA) e então succinato. O succinato será transformado em fumarato pela succinato desidrogenase (SDH), tornando-se depois malato. O malato será mudado em oxaloacetato com o auxílio da malato desidrogenase (MDH).

Em células periféricas, a atividade da cadeia transportadora de elétrons está alterada em transtornos psiquiátricos como o autismo (Giulivi et al., 2010) e a esquizofrenia (Dror et al., 2002). Devido à facilidade de avaliação, a atividade de complexo I foi proposta como marcador de estado na esquizofrenia (Dror et al., 2002). Só dois estudos em células periféricas avaliaram o potencial da atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons no THB, obtendo resultados negativos, mas contando com amostras bastante pequenas (n=10 e n=12, respectivamente) (Ben-Shachar et al., 1999; Gubert et al., 2013).

A atividade da cadeia transportadora de elétrons culmina na produção de espécies reativas de oxigênio. Se a produção de espécies reativas de oxigênio é excessiva ou se a sua eliminação é ineficiente, as espécies reativas de oxigênio vão causar estresse oxidativo. O estresse oxidativo é nocivo para a célula, estando ligado ao dano na transdução de sinal, na plasticidade estrutural e na resiliência (Massaad & Klann, 2011). A fosforilação oxidativa inadequada leva à deficiência na produção de ATPs, podendo se refletir no potencial de membrana celular, que ficaria alterado porque as bombas de cálcio não teriam energia para controlar o fluxo do íon.

A atuação da mitocôndria na homeostase do cálcio intracelular não se restringe à produção de energia, mas compreende também o tamponamento do cálcio citosólico, prevenindo que altos níveis do íon no citosol induzam estresse e excitotoxicidade (Baron et al., 2003; Rizzuto & Pozzan, 2006). Níveis aumentados de cálcio basal intracelular (potencialmente tóxicos) foram observados em plaquetas e linfócitos no THB (Hough et al., 1999). Além disso, houve maiores elevações de cálcio em resposta a estímulo com diversas substâncias em células periféricas no THB (Dubovsky et al., 1989; Kusumi et al., 1992; Berk et al., 1994; Hough et al., 1999; Suzuki et al., 2001), sendo o lítio capaz de regular a resposta de cálcio à provocação (Wasserman et al., 2004). As evidências tornam provável que o desequilíbrio no cálcio

intracelular visto no THB possa estar relacionado à atividade mitocondrial alterada (Kato, 2008).

Agressões celulares como excesso de influxo de cálcio ou potencial de membrana mitocondrial diminuído podem levar à maior permeabilidade da membrana mitocondrial. Frequentemente isso se dá através da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. O poro de transição de permeabilidade mitocondrial é um complexo de proteína que une o interior e o exterior da membrana mitocondrial. A sua abertura libera proteínas mitocondriais como o citocromo C e pró-caspases, que são facilitadoras de apoptose (Hotchkiss et al., 2009; Machado-Vieira et al., 2009). Os mecanismos pró-apoptóticos deflagrados podem ser muito nocivos mesmo se não causam morte celular, pois estão ligados à perda de sinapses (ou "apoptose sináptica") (Quiroz et al., 2008).

O THB está longe de ser considerado uma doença mitocondrial clássica, pois não apresenta os acometimentos típicos destas doenças (e.g., atrofia de retina, ataxia, miopatia, intolerância ao exercício físico, etc.). As evidências, porém, apontam para disfunções sutis ligadas a níveis mais básicos, provavelmente de codificação nuclear.

1.2. Função mitocondrial no THB

A mitocôndria tem função crucial de resiliência celular e manejo do estresse. Este papel é importante, já que o estresse celular pode ativar cascatas de apoptose. Quando estas não levam à morte celular dos neurônios, podem induzir atrofia de sinapses e neurites, mecanismos ligados à fisiopatogenia do THB (Quiroz et al., 2008). Diversos fatores que determinam a sobrevivência e o crescimento neuronal são afetados pelo lítio (Machado-Vieira et al., 2009), droga padrão-ouro no tratamento do THB.

Muitas evidências apontam uma associação entre disfunção mitocondrial e THB. É bem conhecido o papel fundamental que a mitocôndria tem na produção de energia celular. No THB, o metabolismo de energia mostrou anormalidades tanto pelo aumento de lactato nos estudos avaliando líquido (Regenold et al., 2009), como nos estudos de ressonância magnética com espectroscopia (Stork & Renshaw, 2005; Frey et al., 2007; Ongür et al., 2009), sugerindo comprometimento mitocondrial. Pesquisas enfocando a expressão de genes e proteínas no THB mostram uma diminuição de fatores e enzimas envolvidos na geração e estoque de ATP (Konradi et al., 2004; Iwamoto et al., 2005; MacDonald et al., 2006; Pennington et al., 2008).

Além disso, a associação do THB com genes de função mitocondrial está referenciada também por estudos genéticos (Shao et al., 2008; Xu et al., 2008; Rollins et al., 2009; Zhang et al., 2009). Reforçando a relevância destes achados, há relatos de doenças classicamente mitocondriais com apresentação semelhante ao THB (Grover et al., 2006; Mancuso et al., 2008). Esta semelhança também sugere que a fisiopatogenia do THB possa estar vinculada à mitocôndria.

1.3. Alterações de metabolismo energético em estudos de neuroimagem no THB

Espectroscopia por Ressonância Magnética (ERM) é uma técnica que permite a visualização da química cerebral *in vivo*, incluindo metabólitos relacionados com energia, pH e compostos do metabolismo de fosfolípides. Estudos com ERM de prótons (^1H) encontraram níveis anormais de N-acetil-aspartato, glutamato/glutamina, lactato, compostos contendo colina e mio-inositol no THB, enquanto estudos com ERM de fósforo (^{31}P) acharam anormalidades em concentrações de fosfocreatinina e fosfomonoésteres e pH intracelular em pacientes com THB.

Acredita-se que a disfunção mitocondrial no THB englobe alterações na fosforilação oxidativa, levando a um desvio para a produção de energia por via anaeróbica (Figura 2) com pior rendimento energético e consequente prejuízo do metabolismo de fosfolípide anormal.

O N-acetil-aspartato é um amino-ácido especialmente envolvido em produção de energia neuronal e cujos níveis refletem a função mitocondrial (Madhavarao et al., 2003). Vários estudos de ERM de prótons mostraram diminuição de níveis de N-acetil-aspartato cerebral no THB (Deicken et al., 1995; Winsberg et al., 2000; Cecil et al., 2002; Bertolino et al., 2003; Chang et al., 2003; Sassi et al., 2005; Atmaca et al., 2006).

O pH cerebral se mostrou diminuído nos estudos no THB em especial no lobo frontal de pacientes eutímicos (Kato et al., 1992, 1993; Kato et al., 1998). Os pacientes em depressão (Kato et al., 1992) e em mania (Kato et al., 1993) tiveram níveis de pH mais alto do que pacientes eutímicos, o que levou Kato & Kato (2000) a propor o pH baixo como um traço do THB, independente da presença de sintomas. A diminuição do pH cerebral pode ser explicada também pelo aumento de lactato cerebral no giro cingulado (Dager et al., 2004) e aumento de lactato encontrado em líquido de pacientes com THB (Regenold et al., 2009).

O lactato cerebral em região frontal se correlacionou com a gravidade da mania mensurada pela escala de mania de Young (YMRS) (Kim et al., 2007), sugerindo que o lactato possa ser um marcador de estado no THB. Tendo em conta que o desvio do metabolismo para a via anaeróbica implica em maior produção de lactato, o achado reforça o modelo proposto.

Anormalidades em glutamato/glutamina também foram encontradas no THB. O aumento de níveis de glutamato intracelular pode induzir hiperativação neuronal, então aumentando a demanda energética com um subsequente desvio glicolítico (Dager et al., 2004). Uma meta-análise recente mostrou níveis cerebrais aumentados de glutamato/glutamina em pacientes com THB medicados e não-medicados (Gigante et al., 2012). Além disso, encontrou-

se normalização de níveis cerebrais de glutamato/glutamina pelo tratamento com lítio do THB (Friedman et al., 2004; Shibuya-Tayoshi et al., 2008), o que é coincidente com outros achados de efeitos protetores mitocondriais do fármaco.

Outro composto estudado no THB é a fosfocreatina, um composto altamente energético que funciona como estoque de ATP. Concentrações alteradas de fosfocreatina refletem aporte insuficiente de ATP para a célula. Níveis diminuídos de fosfocreatina no lobo frontal foram achados em mania, depressão e eutímia no THB (Kato et al., 1995; Shi et al., 2012), ainda que Shi *et al.* (2012) tenham encontrado aumento de fosfocreatina em lobo frontal no THB.

A manutenção da membrana celular requer mais de 13% do ATP produzido na célula (Purdon & Rapoport, 1998). Neste contexto, a produção de energia deficiente causada pela disfunção mitocondrial poderia comprometer o metabolismo de fosfolípide, explicando as alterações em níveis cerebrais de colina, mioinositol e fosfomonoéster encontradas no THB.

Diversos estudos mostraram níveis aumentados de colina ou razões aumentadas de colina/creatina + fosfocreatina no THB, especialmente em gânglios da base (Kato et al., 1996; Hamakawa et al., 1999; Moore et al., 2000; Senaratne et al., 2009), indicando uma provável produção aumentada de fosfatidilcolina para a síntese de membrana celular (Farber et al., 2000).

Também apontam para alteração do metabolismo de membrana alguns estudos de ERM de prótons que encontraram aumento (e tendência a aumento) de níveis cerebrais de mioinositol no THB (Winsberg et al., 2000; Davanzo et al., 2003). Há evidências de normalização e até mesmo diminuição das concentrações cerebrais de mioinositol com o uso de lítio no THB (Moore et al., 1999; Davanzo et al., 2001; Silverstone et al., 2002).

Os níveis cerebrais de fosfomonoéster estão diminuídos em pacientes com THB eutímicos (Kato et al., 1992, 1993; Deicken et al., 1995; Yildiz et al., 2001) e aumentados em pacientes com mania e depressão bipolar (Kato et al., 1991; Kato et al., 1992, 1993; Kato et al.,

1994; Yildiz et al., 2001), indicando que algumas alterações no metabolismo de membrana possam ser estado-dependentes. O aumento de fosfomonoéster (com concomitante aumento de produção de membrana) pode refletir uma tentativa de normalização de processos celulares desregulados pela disfunção mitocondrial (Stork & Renshaw, 2005).

1.4. Estresse oxidativo no THB

Estresse oxidativo é o resultado da desregulação do balanço pró-oxidativo-antioxidativo em favor da oxidação, levando a dano (Sies, 1991). O cérebro é um órgão especialmente vulnerável ao estresse oxidativo pela sua alta demanda energética e limitada capacidade antioxidante (Reiter, 1995). Existem cada vez mais evidências de uma relação entre a fisiopatologia dos transtornos neuropsiquiátricos e o aumento de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Kuloglu et al., 2002; Ranjekar et al., 2003; Steckert et al., 2010).

O metabolismo normal das mitocôndrias gera espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons de todas as células do corpo (Chinopoulos & Adam-Vizi, 2006). Em circunstâncias normais, as espécies reativas de oxigênio são eliminadas por mecanismos celulares antioxidantes. Entre eles, a ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que converte o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), da catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx), que transformam o H_2O_2 em $H_2O + 1/2 O_2$ (Figura 3). Embora as espécies reativas de oxigênio tenham um papel fisiológico, se as espécies reativas de oxigênio estão presentes em excesso podem causar dano celular, levando à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e dano ao DNA.

Outra molécula com potencial oxidativo é o óxido nítrico (NO), que reage com o $O_2^{\cdot-}$ formando peroxinitrito ($ONOO^-$), espécie muito citotóxica (Pacher et al., 2007). Observou-se aumento de dano oxidativo induzido pelo $ONOO^-$, medido pelos níveis de 3-nitrotirosina em

cérebros *post-mortem* de pacientes com THB (Andreazza et al., 2010). Também se encontrou aumento nos níveis de NO em soro e plasma de pacientes com THB (Savas et al., 2002; Yanik et al., 2004; Savas et al., 2006; Gergerlioglu et al., 2007; Selek et al., 2008), o que é coincidente com o achado em cérebros *post-mortem*. Apesar disso, Ozcan *et al.* (2004) e Aykut *et al.* (2012) encontraram diminuição de NO no THB.

Apesar de o NO ter um papel no estresse oxidativo, o NO também está associado à neuromodulação e à neuroproteção (Calabrese et al., 2007). A modulação do NO se mostrou associada à liberação de neurotransmissores (Prast & Philippu, 2001) e à plasticidade sináptica (Bon & Garthwaite, 2003). O papel do NO na neuroproteção está associado com a diminuição do influxo de Ca^{2+} com a consequente inibição dos mecanismos pró-apoptóticos e de morte celular (Liu & Stamler, 1999). Além disso, o NO aumentou as proteínas neuroprotetoras Akt (Ciani et al., 2002) e a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) (Riccio et al., 2006). Os efeitos do NO dependem das suas concentrações. Em níveis fisiológicos o NO tem um papel neuromodulador e neuroprotetor, enquanto em altas concentrações o NO se mostra neurotóxico e está associado ao estresse oxidativo (Calabrese et al., 2007).

Figura 3. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é transformado em $H_2O + \frac{1}{2}O_2$ pela ação das enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). O óxido nítrico (NO) é transformado em peroxinitrito ($ONOO^-$). $ONOO^-$ e H_2O_2 causam dano oxidativo, refletido na peroxidação lipídica com aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O dano oxidativo pode ser medido pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador de peroxidação lipídica, processo que gera distúrbios nos sistemas de sinalização de mensagem de lipídios (Bazan et al., 2005). Em cérebros *post-mortem* de pacientes com THB, Andreazza *et al.* (2010) encontraram aumento de oxidação de proteínas, mensurado por carbonilação proteica. Há também diversas evidências de aumento de estresse oxidativo em THB verificadas em sangue periférico. Aumentos nos níveis de TBARS foram encontrados em estudos usando plasma e soro, tanto em pacientes com THB medicados (Kuloglu et al., 2002; Andreazza et al., 2007) como em pacientes com o transtorno não medicados (Machado-Vieira et al., 2007).

A atividade da enzima CAT esteve diminuída em diversos estudos (Andreazza et al., 2007; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003), estando aumentada apenas em um estudo, em pacientes com início recente de THB (Machado-Vieira et al., 2007). Os resultados para a atividade da enzima SOD mostram aumento na maior parte dos estudos (Kuloglu et al., 2002; Savas et al., 2006; Andreazza et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007), embora tenha sido encontrada diminuída em alguns estudos (Gergerlioglu et al., 2007; Selek et al., 2008). O desequilíbrio da razão SOD/CAT tem sido sugerida como parâmetro mais significativo que a SOD e a CAT isoladamente para avaliação de estresse oxidativo, já que uma enzima age sequencialmente depois da outra na eliminação das espécies reativas de oxigênio (Machado-Vieira et al., 2007; Khairova et al., 2012). Houve diminuição da razão SOD/CAT com o tratamento com o lítio em pacientes em mania (Machado-Vieira et al., 2007) e em voluntários saudáveis (Khairova et al., 2012). Os achados da atividade de GPx são ainda inconclusivos, pois acharam-se tanto aumento (Andreazza et al., 2007) como diminuição (Ozcan et al., 2004) em pacientes com THB.

1.5. O estresse oxidativo está associado a alterações em neurotransmissores no THB

O estresse oxidativo se associou também ao desequilíbrio de neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia do THB. Há evidências que associam o estresse oxidativo à hiperativação dos sistemas glutamatérgico e dopaminérgico (Berk et al., 2011), bem como a uma diminuição da transmissão gabaérgica (Brambilla et al., 2003) no THB.

A hiperatividade glutamatérgica leva a um influxo de cálcio aumentado (Plein & Berk, 2001), que aumenta o estresse oxidativo (Shao et al., 2005). Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo também se associou à produção aumentada de glutamato (Volterra et al., 1994; Lovell et al., 2000).

A produção dopaminérgica excessiva aumenta o estresse oxidativo devido à produção de espécies reativas de oxigênio no metabolismo de dopamina (Miyazaki & Asanuma, 2008). Além disso, o mecanismo oposto acontece quando o aumento de estresse oxidativo impede a recaptação de dopamina, aumentando portanto a atividade dopaminérgica (Kim & Andreazza, 2012).

A peroxidação lipídica da membrana plasmática, induzida quando ocorre aumento de estresse oxidativo, se associou a uma diminuição de liberação de ácido gamma-aminobutírico (GABA) em sinaptossomos (Palmeira et al., 1993).

1.6. Associação do THB com genes mitocondriais e sua expressão diferencial no transtorno

O papel da mitocôndria no THB também foi ressaltado por estudos genéticos e de expressão. Estudos de ligação mostraram associação do THB com genes de função mitocondrial (Kirk et al., 1999; Washizuka et al., 2003b; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2009). Além disso, polimorfismos e mutações de DNAmT estão associados com THB (Kato et al., 1997; Kato et al., 2000, 2001; Munakata et al., 2004; Munakata et al., 2005; Shao et al., 2008).

O gene nuclear *NDUFV2* codifica uma proteína de subunidade do complexo I mitocondrial. Estudos mostraram associação de polimorfismos de *NDUFV2* com THB (Washizuka et al., 2003b; Munakata et al., 2004; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2009; Doyle et al., 2011); além disso, o gene *NDUFV2* também teve expressão diferencial em células periféricas (Washizuka et al., 2003b; Washizuka et al., 2005; Washizuka et al., 2009) e em cérebros *post-mortem* de pacientes com THB (Nakatani et al., 2006; Ben-Shachar & Karry, 2008).

Polimorfismos de DNAmT em posições 5178 e 10398 estão associados ao THB (Kato et al., 2000, 2001). Pacientes portadores do polimorfismo 10398A tiveram melhor resposta ao

tratamento de manutenção com lítio (Washizuka et al., 2003a) e em células linfoblastóides houve diferentes respostas evocadas de Ca^{+2} comparando-se os haplótipos 5178/10398 de DNAmT (Kato et al., 2003).

Encontrou-se associação entre a mutação de DNAmT 3644T>C e THB, havendo diminuição de potencial da membrana mitocondrial e piora de atividade de complexo I em cíbridos transmitocondriais com a mutação (Munakata et al., 2004). De forma semelhante, achou-se associação do THB com o gene nuclear *DISC-1* (Thomson et al., 2005; Perlis et al., 2008; Hennah et al., 2009; Schosser et al., 2010; Xiao et al., 2011; Ram Murthy et al., 2012), que codificou proteínas mitocondriais de estrutura alterada em células linfoblastóides no THB (Eykelboom et al., 2012).

Os estudos de expressão genética têm corroborado com a hipótese de disfunção mitocondrial na fisiopatogenia do THB. Em cérebros *post-mortem*, Konradi *et al.* (2004) encontraram uma expressão diminuída de vários genes que codificam subunidades dos complexos I-V em hipocampo de pacientes com THB. Alguns dos genes encontrados também foram expressos em menor quantidade no córtex frontal de pacientes com THB (Sun et al., 2006).

Dentre os genes que tiveram expressão alterada no THB, cabe ressaltar alguns genes de função mitocondrial associados à fosforilação oxidativa que tiveram achados que já foram replicados na literatura. Os genes que codificam proteínas da ATP sintase *ATP5C1* e *ATP5G3* tiveram expressão diferencial tanto em córtex frontal (Sun et al., 2006) como em hipocampo de pacientes com THB (Konradi et al., 2004). Sun *et al.* (Sun et al., 2006) encontraram expressão diferencial dos genes codificadores de proteínas do complexo I *NDUFS7*, do complexo III *UQCRC2* e da citocromo C oxidase *COX6C* em córtex frontal no THB, dado corroborado por achados de expressão diferencial destes genes em células periféricas de pacientes com THB

(Washizuka et al., 2005; Naydenov et al., 2007). Washizuka *et al.* (2005) e Naydenov *et al.* (2007) encontraram expressão diferencial dos genes codificadores de proteínas do complexo I *NDUFA6* e *NDUFV2* em células periféricas de pacientes com THB.

O efeito do lítio na expressão genética é coincidente com os achados. Em cérebros *post-mortem* de pacientes tratados com lítio observou-se um aumento da expressão do gene *NDUFS7*, que codifica uma proteína do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Sun et al., 2006). O achado reforça a hipótese de que o lítio tenha um efeito neuroprotetor na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial; contudo o efeito do lítio nunca foi estudado na atividade da cadeia transportadora de elétrons em humanos *in vivo*.

2. JUSTIFICATIVA

Nesta seção se justifica a seleção da amostra. As justificativas para as dosagens específicas são abordadas nos manuscritos elaborados (nos anexos) e no setor "5.4. Resultado a ser submetido".

2.1. Neuropressão no THB e a investigação de biomarcadores

Há evidências crescentes de que neurobiologia do THB muda de acordo com a neuropressão da doença. Clinicamente, o maior número de episódios se relaciona com uma pior resposta à medicação, mais sintomas, declínio de qualidade de vida (Magalhães et al., 2012) e perda neurocognitiva (López-Jaramillo et al., 2010).

A piora crescente nos parâmetros clínicos é coincidente com os achados biológicos. Nos estudos de neuroimagem em THB, observa-se aumento de ventrículos laterais, alterações não específicas em substância cinzenta e hiperintensidades em substância branca (Kempton et al., 2008). Ainda que o dado seja controverso, sugere-se que as alterações de neuroimagem progridam com o tempo e o número de episódios (Strakowski et al., 2002; Lisy et al., 2011).

Além disso, observa-se um progressivo aumento de inflamação. Verificaram-se aumento de TNF-alfa e diminuição de interleucina-10 (IL-10) e de interleucina-6 (IL-6) em pacientes com THB em fases tardias comparados aos pacientes com início recente (Kauer-Sant'Anna et al., 2009); o aumento de TNF-alfa e a diminuição de IL-6 se correlacionaram com o aumento de tempo de doença.

O suporte neurotrófico parece diminuir com a progressão do THB. Os pacientes com THB em fase tardia, mas não os pacientes com THB na fase inicial, tiveram diminuição de *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) em comparação com controles (Kauer-Sant'Anna et

al., 2009). De forma semelhante ao que se viu nos parâmetros inflamatórios, a diminuição de BDNF se correlacionou com o aumento de tempo de doença (Kauer-Sant'Anna et al., 2009).

No estresse oxidativo, um estudo encontrou aumento de atividades de glutathione redutase e de glutathione S-transferase em pacientes com THB em fase tardia comparados a controles, enquanto pacientes com THB em fase inicial não mostraram esta alteração (Andreazza et al., 2009). Houve aumento de atividade de catalase em pacientes não-medicados com THB de início recente (Machado-Vieira et al., 2007), enquanto se observou diminuição de catalase em pacientes medicados com THB em fase mais avançada (Andreazza et al., 2007). Os estudos sugerem que seja possível uma diferença na regulação do estresse oxidativo com o progredir do THB.

A proposta da neuroprogressão vem da teoria de que em transtornos de humor de início recente haja alterações compensatórias para preservar a homeostase cerebral (Post, 2007). Nas fases iniciais, fatores adaptativos atuam auxiliando a melhora clínica. Com o tempo, essas alterações compensatórias iriam sendo perdidas, piorando a resposta clínica e aumentando a severidade do transtorno. Apesar da proposta de Post (2007), pouco se conhece acerca das alterações iniciais adaptativas na biologia do THB.

Os dados ainda são insuficientes para propor algo que auxilie na clínica, embora diversos progressos tenham sido realizados no conhecimento acerca da neurobiologia do THB. Os marcadores validados no THB são poucos e ainda não se conhece bem a associação dos parâmetros clínicos com eles (Machado-Vieira, 2012). Dentro deste contexto, as alterações mitocondriais em pacientes com THB de início recente também foram pouco estudadas.

2.2. Subtipo e fase no THB

Juntamente com o tempo de história, outro aspecto relevante na clínica é o subtipo do THB. Sabe-se que o THB I e o THB II tem curso clínico e resposta diferente ao tratamento (Benazzi, 2007). Apesar disso, e do fato de a genética dos dois subtipos do THB também se mostrar diferente, as diferenças neurobiológicas do THB I e do THB II foram pouco estudadas (D'Addario et al., 2012; Huang et al., 2012).

A maior parte dos estudos em neurobiologia do THB enfoca o subtipo I ou não separa os dois subtipos nas análises (Vieta & Suppes, 2008). O estudo dos padrões neurobiológicos de cada um dos subtipos poderia permitir adequar o tratamento a necessidades específicas.

Embora o THB se caracterize por fases de mania, depressão ou estado misto, as evidências mostram que os pacientes passam mais tempo com sintomas depressivos do que com sintomas de mania ou mistos. A história natural do THB mostra que isso acontece no THB I, no qual os pacientes passam 3 vezes mais tempo com sintomas depressivos do que com sintomas de hipomania e mania e 5 vezes mais tempo com sintomas depressivos que com sintomas mistos (Judd et al., 2002). Contudo, isso é ainda mais acentuado no THB II, no qual os sintomas depressivos estão presentes cerca de 40 vezes mais que os de hipomania e 22 vezes mais que os mistos (Judd et al., 2003).

Apesar de a depressão bipolar ser clinicamente relevante, as opções terapêuticas com boa evidência de eficácia são limitadas (Grunze et al., 2010; Yatham et al., 2013). Conhecer melhor a neurobiologia da depressão bipolar poderia permitir identificar alvos terapêuticos relevantes para tratamento do THB. Muito embora seja interessante estudar pacientes eutímicos para entender a fisiopatologia do THB, os pacientes eutímicos mais comumente estão em uso de medicações que podem influenciar nos parâmetros biológicos (Modabbernia et al., 2013).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1. Objetivos gerais

É objetivo do estudo conhecer melhor a neurobiologia do THB: entender o envolvimento da fosforilação oxidativa e do metabolismo mitocondrial na fisiopatologia do THB, bem como compreender o papel do estresse oxidativo, das enzimas antioxidantes e do NO e o controle do número de mitocôndrias no transtorno. Além disso, é objetivo do estudo entender o efeito do tratamento com lítio por 6 semanas nestes alvos.

3.2. Objetivos específicos

Quanto ao estudo da neurobiologia do THB, os objetivos específicos são estudar na depressão bipolar (antes do tratamento):

- 1) O estresse oxidativo em plasma através da avaliação das atividades da SOD, da CAT, da GPx e da dosagem de TBARS em pacientes comparados com controles;
- 2) O conteúdo de DNAm em leucócitos em pacientes comparados com controles;
- 3) Os níveis de NO plasmático em pacientes comparados com controles;
- 4) As atividades dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia transportadora de elétrons em leucócitos em pacientes comparados com controles;
- 5) As atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em leucócitos em pacientes comparados com controles;
- 6) A correlação de cada um destes marcadores (mencionados de 1 a 5) com os escores da escala de depressão de Hamilton (de 21 itens) (Hamilton, 1960);

Pretende-se também avaliar o efeito do lítio:

7) Comparando antes e depois tratamento da depressão bipolar cada um dos biomarcadores (mencionados de 1 a 5);

8) Correlacionando a mudança de biomarcadores (mencionados de 1 a 5) de antes para depois do tratamento com lítio com a mudança na escala de depressão de Hamilton (de 21 itens) do pré-tratamento para o pós-tratamento;

9) Comparando os marcadores (citados de 1 a 5) entre respondedores e não respondedores e entre pacientes que remitiram e que não remitiram.

3.3. Hipóteses

Hipótese 0

Não há diferença entre controles saudáveis e pacientes com depressão bipolar antes do tratamento em relação:

1) Ao estresse oxidativo em plasma através da avaliação das atividades da SOD, da CAT, da GPx e da dosagem de TBARS;

2) Ao conteúdo de DNAm^t em leucócitos;

3) Aos níveis de NO plasmático;

4) Às atividades dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia transportadora de elétrons em leucócitos;

5) Às atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em leucócitos;

Além disso:

6) Não há correlação dos escores da escala de depressão de Hamilton (21 itens) com os marcadores (citados de 1 a 5);

Quanto ao efeito do lítio:

7) Não há diferença antes e depois tratamento da depressão bipolar em cada um dos biomarcadores (citados de 1 a 5);

8) Não há correlação da mudança de biomarcadores (citados de 1 a 5) de antes para depois do tratamento com lítio com a mudança na escala de depressão de Hamilton (de 21 itens) do pré-tratamento para o pós-tratamento;

9) Não há diferença de biomarcadores (citados de 1 a 5) entre respondedores e não respondedores e entre pacientes que remitiram e que não remitiram.

Hipótese 1

Há diferença entre controles saudáveis e pacientes com depressão bipolar antes do tratamento em relação:

1) Ao estresse oxidativo em plasma através da avaliação das atividades da SOD, da CAT, da GPx e da dosagem de TBARS;

2) Ao conteúdo de DNAmT em leucócitos;

3) Aos níveis de NO plasmático;

4) Às atividades dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia transportadora de elétrons em leucócitos;

5) Às atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em leucócitos;

Além disso:

6) Há correlação dos escores da escala de depressão de Hamilton (21 itens) com os marcadores (citados de 1 a 5);

Quanto ao efeito do lítio:

7) Há diferença antes e depois tratamento da depressão bipolar em cada um dos biomarcadores (citados de 1 a 5);

8) Há correlação da mudança de biomarcadores (citados de 1 a 5) de antes para depois do tratamento com lítio com a mudança na escala de depressão de Hamilton (de 21 itens) do pré-tratamento para o pós-tratamento;

9) Há diferença de biomarcadores (citados de 1 a 5) entre respondedores e não respondedores e entre pacientes que remitiram e que não remitiram.

4. MÉTODOS

4.1. Seleção da amostra

A captação de pacientes com THB se deu através de divulgação do estudo pela Internet e pela mídia. A partir de 251 *emails*, o candidato ao doutoramento, MVZ e RMV fizeram triagem por telefone de 155 pessoas, das quais 42 foram avaliadas pessoalmente no ambulatório do IPq-HCFMUSP. Deste total, foram incluídos 31 pacientes com THB em fase depressiva.

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- a) Idade entre 18 e 45 anos de idade;
- b) Diagnóstico de THB tipo I ou II, em episódio depressivo pelos critérios da 4a edição do Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) através da Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do DSM-IV (SCID) (First et al., 1995);
- c) Pontuação mínima de 18 na escala de depressão de Hamilton ;

Foram critérios de exclusão do estudo:

- a) Mais de 5 anos de história de transtorno de humor, com intuito de excluir pacientes com THB com alterações mais tardias (Berk et al., 2013);
- b) Uso de lítio nas oito semanas prévias à inclusão;
- c) Outro transtorno mental do eixo I.

Foi permitido aos pacientes com THB I estar em uso de um antipsicótico ou um estabilizador de humor ao ingressar no estudo, enquanto os pacientes com THB II estavam ao menos 6 semanas sem uso de outras drogas (exceto hipnótico). Para controles, foram selecionados candidatos entre comunidades próximas à nossa instituição, pareados por idade (± 3 anos), podendo haver mais de um controle por paciente e mais de um paciente correspondendo a um controle.

Todos os controles foram avaliados pela SCID pelo candidato ao doutoramento e por outros colegas, sendo critérios de exclusão:

- a) Presença de qualquer transtorno mental ao longo da vida, incluindo transtornos relacionados a uso de substância (exceto uso de nicotina e fobia específica);
- b) Familiares de 1º grau com transtorno psiquiátrico;
- c) Retardo mental;
- d) Presença de condição neurológica ou doença clínica com potencial de afetar sistema nervoso central;
- e) Antecedente de trauma crânio-encefálico com perda de consciência.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética (protocolo 58/10, aprovado em 24/8/2010) e todos os participantes foram informados a respeito dos objetivos e procedimentos realizados e os mesmos ou seus familiares assinaram termo de consentimento para entrada no estudo.

4.2. Desenho do estudo

Este estudo é o braço de um projeto Jovem Pesquisador da Fapesp (2010/16643-0), que avaliou outras variáveis laboratoriais e de neuroimagem entre agosto de 2010 e julho de 2012. O presente estudo analisou parâmetros de função mitocondrial, estresse oxidativo e NO em pacientes com THB e controles saudáveis. Os pacientes estavam em episódio depressivo e foram tratados por 6 semanas com lítio. A dose inicial foi de 450mg/dia de carbonato de lítio, com ajustes de dose ao longo do estudo, controlando a litemia sérica e tendo em conta a melhora clínica.

Antes de receberem medicação, na primeira visita (V1) os pacientes fizeram coleta de sangue e foram avaliados por escalas psicométricas: escala de depressão de Hamilton de 21 itens para quantificação de sintomas depressivos (HAM-D) (Hedlund &Vieweg, 1979), escala

de mania de Young para avaliação de sintomas de mania (Young et al., 1978) e a escala de Impressão Clínica Global (CGI) – gravidade e a CGI – melhora (Guy, 1976) para avaliação de gravidade de sintomas. Os avaliadores foram o candidato ao doutoramento e outros psiquiatras com experiência em aplicação de escalas psicométricas. As escalas foram aplicadas também 1 semana (V2), 2 semanas (V3), 4 semanas (V4) e 6 semanas depois do tratamento com lítio (V5), ao final do estudo. Na V5 os pacientes fizeram também nova coleta de sangue além das avaliações por escalas.

A resposta foi caracterizada por melhora de ao menos 50% dos valores iniciais da HAM-D, enquanto a remissão de sintomas compreendeu pontuação de HAMD<8 e de YMRS<8.

4.3. Análises laboratoriais

4.3.1. Colaborações e participação do candidato ao doutoramento em ensaios

Depois de definido o enfoque do projeto na neuroproteção e função mitocondrial no THB, o candidato ao doutoramento procurou se inteirar de outras análises possíveis dentro da mesma linha de pesquisa. Então firmou uma colaboração com a Profa. Dra. Suely K. N. Marie do Laboratório de Investigação em Neurologia (LIM15) do HC-FMUSP, onde foram realizadas a extração e a quantificação do conteúdo de DNAm dos leucócitos.

O candidato ao doutoramento também firmou uma colaboração com o Prof. Dr. Emílio Streck do Laboratório de Bioenergética da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, onde foram realizadas em leucócitos as dosagens das atividades dos complexos I-IV da cadeia transportadora de elétrons e das enzimas do ciclo do ácido cítrico citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase.

A última colaboração firmada pelo candidato foi com a Profa. Dra. Elisa M. Higa, do Laboratório de Óxido Nítrico da Escola Paulista de Medicina-Unifesp, onde a dosagem de NO plasmático foi realizada no *Nitric Oxide Analyzer*, um aparelho específico para a dosagem de NO.

O candidato ao doutoramento assistiu a todos os ensaios, exceto à dosagem de atividade de SOD e GPx. Além de assistir aos ensaios, o candidato realizou ativamente os seguintes ensaios: avaliação da atividade da cadeia transportadora de elétrons e das enzimas do ciclo de Krebs, avaliação de atividade do NO e verificação do conteúdo de DNAm.

4.3.2. Dados específicos dos ensaios laboratoriais

Os ensaios laboratoriais foram realizados com leucócitos e plasma sanguíneo coletados de pacientes com THB no início do estudo e ao final do ensaio clínico com lítio. Os pacientes e controles não tiveram todas as amostras incluídas em cada análise devido à complexidade do estudo. Os pacientes fizeram a coleta de sangue através de punção venosa em veia antecubital, no período matutino (entre 8h e 10h), em tubos contendo EDTA e citrato. Todos os sujeitos estavam em jejum de ao menos 8 horas.

Para a obtenção de leucócitos, após a coleta, centrifugaram-se os tubos de sangue contendo EDTA junto com ficoll (5mL) a 700xg por 40 minutos a 20°C, retirando-se a camada de leucócitos. Adicionou-se PBS gelado à camada de leucócitos e então centrifugaram-se as amostras por 30 minutos a 700xg a 20°C, em seguida removendo o sobrenadante e lavando com PBS. Depois se procedeu à centrifugação a 700xg por 20 minutos a 20°C, posteriormente descartando o sobrenadante. A amostra foi então ressuspensa em PBS e DMSO 5%, sendo

congelada progressivamente a -10°C por 30 minutos, a -20°C por mais 30 minutos, para depois ser armazenada a -80°C .

Para a separação de plasma, após a coleta dos tubos, retirou-se parte do sangue, que foi então centrifugado em temperatura ambiente a $1620\times g$ por 15 minutos. Retirou-se então o plasma com transfer e acondicionou-se o mesmo em criotubos, congelando a -80°C até as análises.

4.3.3. Atividade dos complexos I, II, II-III e IV e das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase

Depois de descongeladas as amostras, centrifugaram-se os tubos por 10 minutos a 3 mil rpm. Retirou-se o DMSO, adicionando PBS, homogeneizando a amostra. Em seguida, centrifugaram-se as amostras por 10 minutos a 3 mil rpm, retirando-se o PBS. O procedimento de lavagem com PBS foi repetido uma vez.

Procedeu-se então à dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina como padrão.

4.3.1.1. Atividade do complexo I

A atividade da NADH desidrogenase foi avaliada pelo método descrito por Cassina & Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm.

4.3.1.2. Atividades do complexo II

As atividades enzimáticas foram medidas pelo método descrito por Fischer *et al.* (1985), onde a diminuição da absorbância do 2,6-DCIP em 600 nm é usada para o cálculo da atividade do complexo II.

4.3.1.3. Atividades do complexo II-III

A atividade do citocromo *c* oxiredutase (complexo II–III) foi determinada de acordo com Fischer *et al.* (1985), onde foi medido pela redução do citocromo *c* para succinato.

4.3.1.4. Atividades do complexo IV

A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com Rustin *et al.* (1994), calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo *c* reduzido, medido em 550 nm.

4.3.4. Atividade das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase

A citrato sintase foi medida pelo método de Shepherd & Garland (1969) em meio de incubação contendo DTNB, acetil-Coenzima A e Triton X-100. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato e acompanhada em 412 nm.

A atividade NADH-específica da malato desidrogenase foi avaliada espectrofotometricamente conforme o método descrito por Kitto (1969). A reação foi iniciada após a adição de oxaloacetato e o consumo de NADH foi acompanhado através da redução da absorbância em 340 nm durante 3 a 5 minutos a 37°C.

Para medir a atividade da enzima succinato desidrogenase, no meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, succinato de sódio 1 mM e dicloroindofenol (DCIP) 9 µM foi adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140 µg de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 µM, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 µM. A redução do DCIP foi determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C (Fischer *et al.*, 1985). A atividade está expressa em nmol. (min . mg de proteína)⁻¹.

4.3.5. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

As dosagens de atividade de SOD, CAT e GPx e de níveis de TBARS foram feitas em duplicata por meio de *kits* disponíveis comercialmente, enquanto a avaliação de atividade de NO foi feita por quimioluminiscência em aparelho específico (*Nitric Oxide Analyzer*).

Calculou-se a razão SOD/CAT, indicador de estresse oxidativo.

4.3.5.1. Avaliação da atividade de SOD em plasma

A avaliação da atividade de SOD se deu através do *Superoxide Dismutase Assay Kit* segundo protocolo da *Cayman Chemical Company*®. Descongelaram-se as amostras de plasma. Em seguida adicionaram-se detector de radical e amostra em poços. Depois de adicionar xantina oxidase nos poços, por alguns segundos a placa foi agitada com cuidado e então coberta. Procedeu-se à incubação da placa em agitador por 20 minutos em temperatura ambiente. Então foi lida a absorbância da placa através de espectrofotômetro em 440-460nm.

4.3.5.2. Avaliação da atividade de CAT em plasma

A avaliação da atividade de catalase se deu através do *Catalase Assay Kit* segundo protocolo da *Cayman Chemical Company*®. Descongelaram-se as amostras de plasma. Em seguida adicionaram-se tampão, metanol e amostra em poços. Depois de adicionar peróxido de hidrogênio nos poços, pôs-se a placa em agitador por 20 minutos. Em seguida, hidróxido de potássio e cromógeno foram colocados nos poços e a placa ficou por mais 10 minutos no agitador. Então, periodato de potássio foi adicionado e a placa foi lida através de espectrofotômetro em 540nm.

4.3.5.3. Avaliação da atividade de GPx em plasma

A avaliação da atividade de GPx se deu através do *Glutathione Peroxidase Assay Kit* segundo protocolo da *Cayman Chemical Company*®. Descongelaram-se as amostras de plasma.

Em seguida adicionaram-se tampão, hidroperóxido de cumeno e amostra em poços. Por alguns segundos a placa foi agitada com cuidado e então procedeu-se à leitura da absorbância através de espectrofotômetro em 340nm a cada minuto por 5 minutos.

4.3.5.4. Dosagem de TBARS em plasma

A dosagem de TBARS é uma medida da peroxidação lipídica, indicador de estresse oxidativo. A dosagem de TBARS foi realizada através do *TBARS Assay Kit* segundo protocolo da *Cayman Chemical Company*®. Descongelaram-se as amostras de plasma, colocando-as em tubos. Em seguida, adicionaram-se às amostras SDS e reagente de cor, colocando as amostras em água fervendo. Os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos para depois passarem por centrifugação a 1600xg a 4°C por 10 minutos. As amostras foram colocadas em poços de uma placa e leu-se a absorbância em 530-540 nm.

4.3.5.5. Avaliação de atividade de NO em plasma

A avaliação da atividade de NO foi feita através de quimioluminiscência, método de alta sensibilidade para a detecção da molécula (Hampl et al., 1996). Para isso, usou-se o *Nitric Oxide Analyzer* (NOATM 280, Sievers Instruments, Inc. Boulder, CO, USA), aparelho específico para a medida.

Amostras de plasma a -80°C foram descongeladas. Procedeu-se à desproteinização do plasma adicionando sulfato de zinco (ZnSO₄) a 10% e hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 molar. Após agitação por 30 segundos em vórtex, a amostra foi deixada em repouso por 15 minutos. Em seguida, procedeu-se à centrifugação por 5 minutos em 12 mil rpm. Uma fase sólida ficou ao fundo do tubo, sendo retirado o sobrenadante para o experimento. As amostras extraídas de sobrenadante foram então congeladas a -20°C.

Em um segundo momento, as amostras desproteinizadas foram descongeladas. Colocaram-se as amostras para reagir com vanádio. O nitrito (NO₂⁻) e o nitrato (NO₃⁻),

metabólitos estáveis do NO presentes nas amostras, foram reduzidos a NO através da reação com vanádio. O NO, passando à forma de gás, foi captado por um compartimento do aparelho e reagiu então com ozônio, emitindo luz conforme a reação:

A emissão de energia a partir de um elétron de NO_2 na forma de espectro infravermelho é detectada por um tubo fotomultiplicador. Esta leitura é então processada através de um *software* (NOAnalysisTM software) e os resultados medidos em μM de nitrito produzido. A sensibilidade do NOA para a medida do NO em fase gasosa é de aproximadamente 1 picomol.

4.3.6. Avaliação do conteúdo de DNAm

A avaliação do conteúdo de DNAm se fez através da contagem do número de cópias de DNAm relativo ao número de cópias do DNA nuclear.

4.3.6.1. Extração de DNA

Fez-se a extração de DNA de leucócitos periféricos através de papa de leucócitos segundo o protocolo descrito pelo Kit *QIAamp® DNA Mini* (Qiagen Inc, Hilden, Germany), que permite extrair DNA nuclear e mitocondrial.

Após lavagem do DMSO das amostras com PBS (como descrito acima para as atividades de complexos da cadeia respiratória), fez-se a lise das proteínas das amostras com proteinase K. Então se procedeu à centrifugação das amostras em colunas para retenção de DNA nas membranas de sílica. Fez-se então uma dupla lavagem das colunas com DNA com dois tampões diferentes para retirada de impurezas. Em seguida, foi realizada a eluição das amostras por duas vezes com tampão de eluição, retirando o DNA purificado, que recebeu adição de tampão AE e foi guardado a 4°C.

A qualidade das amostras foi verificada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e as concentrações das mesmas foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm no aparelho *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Inc), em que se considerou satisfatórias as razões em 260/280nm que variavam de 1,8 a 2,0. As amostras-mãe foram estocadas a 4°C em dois tubos (primeira e segunda eluição) e uma alíquota de DNA foi utilizada para a reação de PCR quantitativo em tempo real.

4.3.6.2. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O número de cópias relativo de DNAm_t foi analisado por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando-se 2,5 ng de DNA total extraído de leucócitos periféricos na reação. Um gene de cópia única, hemoglobina beta (HBb), foi utilizado como referência (Kersting *et al.*, 2004). As sequências dos primers utilizados (5'- 3') foram: *DNAm_t F sense* (CCTAGCCGTTTACTCAATCCT), *DNAm_t antisense* (TGATGGCTAGGGTGA_{CTTCAT}), *HBb sense* (GTGAAGGCTCATGGCAAGA) e *HBb antisense*, (AGCTCACTCAGTGTGGCAAAG). A síntese dos *primers* foi realizada pela IDT (Coralville, IA, EUA).

Todos os ensaios foram feitos em duplicata em uma mistura de volume final 10µL, contendo 2,5µL de DNA, 5µL de 2x Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences, Burlington Ontario, Canada), e 2,5µL de *primer* em uma concentração de 100nM.

As condições de reação foram 50°C por 2 min para ativar UNG, 10min de ativação da DNA polimerase a 95°C, 40 ciclos de 15s a 95°C e um minuto de pareamento e extensão a 60°C, seguido de um estágio de curva de dissociação, realizado em um aparelho ABI Prism

7500 (Applied Biosystems). As reações foram repetidas quando os valores de Ct ultrapassaram um desvio padrão de 0,4.

A concentração final utilizada dos *primers* foi de 100nM, o tamanho dos produtos de PCR para *DNAmt* e *HBb* foi de 116pb e 94pb, respectivamente, sendo as eficiências de amplificação dos *primers* na reação de 100%. Os produtos de PCR foram também analisados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídeo, para confirmação da amplificação do tamanho correto do produto. Para cada reação, foram testadas concentrações finais mínimas de *primers* que não prejudicassem a eficiência da reação. A eficiência de amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$) foi calculada utilizando-se diluições seriadas de DNA.

A equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi aplicada no cálculo do número de cópias de *DNAmt* relativo para $E=100 \pm 10\%$, onde $\Delta Ct = \text{média Ct DNAmt} - \text{média Ct HBb}$ e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ paciente após tratamento com lítio} - \Delta Ct \text{ paciente pré tratamento com lítio}$ (Livak & Shmittgen, 2001). A equação $2^{-\Delta Ct}$, foi aplicada no cálculo do número de cópias de *DNAmt* absoluto, onde $\Delta Ct = \text{média Ct DNAmt} - \text{média Ct HBb}$.

4.4. Análise estatística de dados demográficos e clínicos

Para comparar pacientes e controles quanto ao gênero e idade, utilizaram-se o teste de Qui-quadrado e o teste t de Student, respectivamente. Para comparar os valores das escalas de depressão de Hamilton e de mania de Young antes e depois do tratamento, utilizou-se o teste de Wilcoxon sinalizado (tendo em conta a distribuição não-normal). O programa utilizado foi o SPSS 21.0. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

A análise estatística do "Resultado a ser submetido" é descrita na seção dos Resultados (no item 5.4.2).

5. RESULTADOS

5.1. Descrição da amostra e dados clínicos

A amostra compreendeu 31 pacientes, 8 (26%) homens e 23 (74%) mulheres, com média de idade de 28,5 ($\pm 5,4$) anos (Tabela 1). Dos pacientes incluídos, 12 (39%) tinham diagnóstico de THB I e 19 (61%) de THB II, estando todos em episódio depressivo. Dois pacientes não completaram o estudo; um paciente descontinuou o tratamento por problemas pessoais não relacionados com o estudo e outro foi excluído por má adesão ao tratamento (níveis de lítio indetectáveis). O tempo médio de doença foi de 36,3 ($\pm 19,4$) meses, 22 (71%) pacientes eram virgens de tratamento e 26 (84%) estavam não-medicados por ao menos 6 semanas antes da inclusão no estudo. Somente 4 (13%) pacientes tinham história prévia de sintomas psicóticos.

Durante o estudo, houve diminuição significativa da pontuação da escala de depressão de Hamilton do início (22,5 $\pm$ 3,5) para o final (7,3 $\pm$ 5,9) ($z=-4,43$, $p<0,001$) e diminuição significativa da pontuação da escala de mania de Young do início (6,1 $\pm$ 5,5) até o final (3,8 $\pm$ 8,6) do ensaio ($z=-3,12$, $p=0,002$). Ao final do estudo, 25 pacientes (80%) responderam ao tratamento e 18 (58%) remitiram. Houve ainda uma diminuição de escores totais da CGI do início (4,3 $\pm$ 0,6) para o fim do estudo (2,1 $\pm$ 1,0) ($p<0,001$). A litemia média ao fim das 6 semanas de estudo foi 0,49 ($\pm 0,20$) mEq/L.

Vinte e oito voluntários saudáveis, 16 (57%) homens e 12 (43%) mulheres, com média de idade 28,3 ($\pm 8,0$) anos foram usados para as comparações com os pacientes.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes em episódio depressivo de Transtorno de Humor Bipolar (THB) e controles saudáveis.

	THB (n=31)	Controles (n=28)	p
Gênero			
homens/mulheres, n (%)	8 (26)/23 (74)	16 (57)/12 (43)	0.02* ^a
Idade, anos	28,6 (±5,4)	28,3 (±8,0)	0.51 ^b
Subtipo de THB			
subtipo I/subtipo II, n (%)	12 (39)/19 (61)		
Duração do transtorno, meses	36,3 (±19,4)		
Virgem de tratamento, n (%)	22 (71)		
Não-medicados, n (%)	26 (84)		
História de psicose, n (%)	4 (13)		
HAM-D			
pré-tratamento/pós-tratamento	22,5 (±3,5)/7.3 (±5,9)		
YMRS			
pré-tratamento/pós-tratamento	6,1 (±5,5)/3,8 (±8,6)		
Resposta, n (%)	25 (80)		
Remissão, n (%)	18 (58)		
Exclusão, n (%)	2 (6)		
Litemia sérica pós-tratamento, mEq/L	0,49 (±0,20)		

HAM-D - escala de depressão de Hamilton, YMRS - escala de mania de Young, a- teste Qui-quadrado, b- teste t de Student, *diferença significativa.

5.2. Resultados publicados

1) **de Sousa RT**, Uno M, Zanetti MV, Shinjo SM, Busatto GF, Gattaz WF, Marie SK, Machado-Vieira R.

Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Jan 3;48:32-5.

Fator de Impacto: 3,552 (2012)

2) **de Sousa RT**, Zarate CA Jr, Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, Machado-Vieira R.

Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium.

J Psychiatr Res. 2014 Mar;50:36-41

doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.11.011. Epub 2013 Dec 6.

Fator de Impacto: 4,066 (2012)

5.3. Resultados submetidos

1) **de Sousa RT**, Zanetti MV, Busatto GF, Mouro MG, Zarate CA Jr, Gattaz WF, Higa EM, Machado-Vieira R.

Lithium Increases Nitric Oxide Levels in Subjects with Bipolar Disorder during Depressive Episodes

Journal of Psychiatric Research

Fator de Impacto: 4,066 (2012)

2) **de Sousa RT**, Streck EL, Zanetti MV, Ferreira GK, Diniz BS, Brunoni AR, Busatto GF, Gattaz WF, Machado-Vieira R.

Lithium Increases Leukocyte Mitochondrial Complex I in Short-Term Bipolar Disorder

Journal of Affective Disorders

Fator de Impacto: 3,295 (2012)

5.4. Resultado a ser submetido: Atividade das Enzimas do Ciclo do Ácido cítrico no THB e o Efeito do Tratamento com Lítio

5.4.1. Justificativa

Dentro da produção de energia mitocondrial o ciclo do ácido cítrico tem um papel importante, já que é responsável por reações que geram substratos para a fosforilação oxidativa acontecer na cadeia transportadora de elétrons. Alterações no ciclo do ácido cítrico portanto podem modificar a produção energética (Blass & Brown, 2000).

Em cérebros *post-mortem* de pacientes com THB observou-se uma diminuição de expressão de RNAm da enzima do ciclo do ácido cítrico malato desidrogenase (Lee et al., 2007). Além disso, em modelos animais de mania induzida por anfetamina e por metanfetamina houve diminuição de atividades da citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase (Feier et al., 2013; Valvassori et al., 2013). Apesar disso, as atividades da citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase nunca foram avaliadas no THB.

O lítio, medicação padrão-ouro no tratamento do THB, foi capaz de atenuar a diminuição de atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico observada no modelo animal de mania induzida por metanfetamina (Feier et al., 2013). O lítio aumentou a atividade da enzima succinato desidrogenase em cérebros *post-mortem* de sujeitos sem transtornos neuropsiquiátricos (Maurer et al., 2009). Em humanos *in vivo*, contudo, nunca se avaliou o efeito do lítio nas atividades da citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase.

5.4.2. Análise estatística

Tendo em vista que as variáveis tinham distribuição não-normal, optou-se por fazer as comparações de pacientes antes do tratamento e controles com o teste Mann-Whitney e pacientes antes e depois do tratamento com o teste Wilcoxon sinalizado; as correlações foram calculadas pelo teste de Spearman. O programa utilizado foi o SPSS 21.0. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

5.4.3. Resultados

As atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico não foram diferentes em pacientes comparados com controles

Em comparação com controles saudáveis, os pacientes com THB (antes do tratamento) não mostraram diferença de atividades de citrato sintase ($z = -0,30$, $p = 0,76$), malato desidrogenase ($z = -0,52$, $p = 0,60$) e succinato desidrogenase ($z = -0,99$, $p = 0,32$) (Tabela 2).

Como houve um desequilíbrio entre o grupo com THB e o grupo controle quanto a gênero ($p = 0,04$), compararam-se as atividades de citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase de homens com mulheres em pacientes (pré-tratamento) e depois de homens com mulheres em controles saudáveis para confirmar a confiabilidade dos resultados.

Não se observou diferença em pacientes homens comparados com mulheres quanto às atividades da enzima citrato sintase ($p = 0,16$), malato desidrogenase ($p = 0,23$) e succinato desidrogenase ($p = 0,37$). De forma semelhante, não houve diferença em controles saudáveis homens comparados com mulheres em relação às atividades da enzima citrato sintase ($p = 0,09$), malato desidrogenase ($p = 0,68$) e succinato desidrogenase ($p = 0,69$). Portanto a diferença de gênero na amostra não teve influência significativa nos dados da amostra.

Tabela 2. Atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em pacientes com depressão bipolar antes e depois do tratamento em comparação com controles saudáveis.

Atividade (nmol/mg de proteína/min)	Antes do Tratamento (n=25)	Depois do Tratamento (n=23)	Controles Saudáveis (n=24)	Pacientes vs. Controles ^a p	Antes vs. Depois do Tratamento ^b p
Citrato Sintase	3,40 (±9,48)	4,00 (±7,82)	3,15 (±6,07)	0,76	0,19
Malato Desidrogenase	51,44 (±87,97)	87,07 (±188,83)	46,08 (±88,75)	0,60	0,45
Succinato Desidrogenase	7,91 (±6,68)	10,54 (±12,25)	9,71 (±8,05)	0,32	0,50

^aTeste de Mann-Whitney, ^bTeste de Wilcoxon sinalizado.

Pacientes com THB I tiveram citrato sintase diminuída em comparação com THB II

A comparação dos subtipos de THB mostrou diminuição de citrato sintase de pacientes com THB I ($0,78 \pm 0,68$ nmol/mg de proteína/min) em comparação com pacientes com THB II ($4,87 \pm 11,71$) ($z = -2,32$, $p = 0,02$) (Figura 4). Em relação à enzima malato desidrogenase não houve diferença nas atividades do THB I ($48,56 \pm 64,16$ nmol/mg de proteína/min) em comparação com THB II ($53,06 \pm 100,88$) ($p > 0,99$), tampouco houve diferença de atividades de succinato desidrogenase do THB I ($6,00 \pm 2,90$ nmol/mg de proteína/min) comparado ao THB II ($8,64 \pm 8,08$) ($z = -0,40$, $p = 0,69$).

Não houve diferença do THB I e controles quanto às atividades de citrato sintase ($p = 0,09$), malato desidrogenase ($p = 0,75$) e succinato desidrogenase ($p = 0,40$) (Figura 4). Tampouco houve diferença do THB II e controles quanto às atividades de citrato sintase ($p = 0,46$), malato desidrogenase ($p = 0,62$) e succinato desidrogenase ($p = 0,43$).

Figura 4. Atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em pacientes com Transtorno de Humor Bipolar I (THB I) e THB II comparados com controles saudáveis. * $p<0,05$.

No pré-tratamento, as atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico não se correlacionaram com os sintomas depressivos

Os escores pré-tratamento da escala de depressão de Hamilton não se correlacionaram com as atividades pré-tratamento das enzimas do ciclo do ácido cítrico citrato sintase ($p=0,32$, $p=0,12$), malato desidrogenase ($p=0,32$, $p=0,12$) e succinato desidrogenase ($p=0,05$, $p=0,80$).

O tratamento com lítio não alterou as atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico

Do início ao fim do tratamento com lítio, não houve mudanças significantes nas atividades da citrato sintase ($z=-1,31$, $p=0,19$), malato desidrogenase ($z=-0,76$, $p=0,45$) e succinato desidrogenase ($z=-0,70$, $p=0,50$).

Não houve associação da resposta com as atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico depois do tratamento

Não houve diferença entre respondedores e não respondedores quanto aos valores pós-tratamento de citrato sintase ($z=-0,86$, $p=0,39$), malato desidrogenase ($z=-0,16$, $p=0,87$) e succinato desidrogenase ($z=-1,14$, $p=0,26$). Também não houve diferença entre pacientes que remitiram e que não remitiram quanto aos valores depois do tratamento de citrato sintase ($z=-0,79$, $p=0,43$), malato desidrogenase ($z=-0,76$, $p=0,45$) e succinato desidrogenase ($z=-0,31$, $p=0,75$).

5.4.4. Discussão

No presente estudo não se encontrou alteração de atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico citrato sintase, malato desidrogenase ou succinato desidrogenase em pacientes com depressão bipolar. Contudo houve uma diminuição de citrato sintase no subtipo I do THB em comparação ao subtipo II. O lítio não alterou a atividade de nenhuma das enzimas do ciclo do ácido cítrico. Este é o primeiro estudo que verifica a atividade das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em pacientes com THB.

Não se encontrou alteração nas atividades das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase em pacientes comparados com sujeitos saudáveis. É possível que no THB de início recente haja mecanismos que impeçam a alteração destas enzimas do ciclo do ácido cítrico (Post, 2007; Berk et al., 2013). Por outro lado, é possível também que a ausência de alteração aconteça só na fase depressiva e não na mania, como sugerem as alterações das enzimas do ciclo do ácido cítrico no modelo de mania induzido por anfetamina (Valvassori et al., 2013) e por metanfetamina (Feier et al., 2013).

Encontrou-se uma diminuição de citrato sintase em pacientes com THB I comparados ao THB II. A citrato sintase é o primeiro passo do ciclo do ácido cítrico e sua atividade tem sido utilizada como marcador de conteúdo de mitocôndrias intactas (Marco et al., 1974). Um achado coincidente com este foi a diminuição do conteúdo de DNAm encontrada em pacientes com THB de subtipo I em comparação ao subtipo II nesta mesma amostra (de Sousa et al., 2014a); de fato, tanto o conteúdo de DNAm como a atividade de citrato sintase são marcadores de conteúdo mitocondrial. O presente achado sugere que haja um menor número de mitocôndrias em pacientes com THB do subtipo I em relação ao subtipo II.

Alinhado ao presente achado, em células linfoblastóides houve diminuição de expressão de genes mitocondriais somente no THB I, mas não no THB II (Washizuka et al., 2005). Isso levanta a hipótese de um maior acometimento da função mitocondrial no THB I e sugere que possa haver perfis neurobiológicos diferentes nos dois subtipos de THB.

Não se observou nenhuma alteração nas atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico depois do tratamento com lítio no presente estudo. Pode ser que o efeito do lítio se observe somente quando há diminuição de atividade das enzimas ou em doses muito altas de lítio. Assim, observou-se o aumento de atividade de succinato desidrogenase após tratamento com lítio de cérebros *post-mortem* de sujeitos sem transtornos neuropsiquiátricos (Maurer et al., 2009).

As atividades de citrato sintase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase podem estar inalteradas no THB. Os achados sugerem uma diferença neurobiológica entre os subtipos I e II do THB. É possível que o THB I apresente diminuição de conteúdo mitocondrial em relação ao THB II. Estudos com amostras maiores são necessários para a confirmação destes dados preliminares.

6. ANÁLISE CRÍTICA DOS ACHADOS

6.1. Neurobiologia do THB

No presente estudo, pacientes com THB de início recente tiveram aumento de atividade de enzimas antioxidantes CAT e GPx, mas sem aumento de peroxidação lipídica (medida por TBARS). As atividades da cadeia transportadora de elétrons e do ciclo do ácido cítrico, os parâmetros de conteúdo mitocondrial e o NO não estavam alterados no THB de início recente.

O aumento das enzimas antioxidantes CAT e GPx encontrado e a diminuição da razão SOD/CAT podem refletir um mecanismo antioxidante compensatório, que estaria presente no THB na sua fase inicial (Figura 5). Evidências clínicas e laboratoriais sugerem que haja uma neuroprogressão no THB, onde a neurobiologia se agrava ao longo do tempo. Propõe-se também a existência de mecanismos compensatórios no estágio precoce do THB que inicialmente impeçam a ocorrência das alterações patológicas (Post, 2007; Berk et al., 2013). A regulação das enzimas antioxidantes poderia diminuir o estresse oxidativo (de Sousa et al., 2014b); a diminuição do estresse oxidativo por sua vez poderia permitir preservar inalterados os parâmetros mitocondriais.

Figura 5. Modelo neurobiológico proposto para o Transtorno de Humor Bipolar de início recente. A fase inicial do THB é marcada por mecanismos compensatórios como o aumento de atividade da catalase e da glutathione peroxidase, que diminuem o estresse oxidativo e preservam as atividades da cadeia transportadora de elétrons e das enzimas do ciclo do ácido cítrico e o número de mitocôndrias (indicado pelo conteúdo de DNA mitocondrial e pela atividade da citrato sintase).

O aumento do estresse oxidativo é prejudicial para lipídios, proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007). Por isso, leva a um pior funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (Tretter et al., 2004) e das enzimas do ciclo do ácido cítrico (Kamboj et al., 2008). A ausência de aumento de estresse oxidativo no presente estudo é coincidente com a ausência de alteração da atividade da cadeia transportadora de elétrons. Os processos da cadeia transportadora de elétrons geram a maior parte da energia produzida na mitocôndria, que é a organela responsável pela produção de energia celular. Os danos à cadeia transportadora de elétrons estão associados a uma diminuição de produção de energia, que por sua vez retroalimentaria o estresse oxidativo (Tretter et al., 2004; Adam-Vizi, 2005). O início recente do THB também poderia explicar a ausência de alteração das enzimas do ciclo do ácido cítrico.

Não se encontrou alteração do conteúdo de DNAm nos pacientes com THB. Tanto o DNAm como a atividade de citrato sintase são indicadores de número de mitocôndrias na célula (Marco et al., 1974; Malik & Czajka, 2013). Sabe-se que o estresse oxidativo pode modular o DNAm. Há evidências de que o estresse oxidativo inicialmente aumente o DNAm numa resposta adaptativa; com a cronificação do estresse oxidativo, haveria diminuição de DNAm (Malik & Czajka, 2013). Pode ser que haja preservação de número de mitocôndrias nas fases iniciais do THB, quando a neurobiologia e a apresentação clínica estão menos comprometidas.

Alinhado a essa hipótese, o THB I, subtipo mais grave do THB, mostrou diminuição de número de mitocôndrias em comparação com THB II, subtipo menos grave; esta diferença se observou com dois indicadores que refletem o número de mitocôndrias, o conteúdo de DNAm e a atividade de citrato sintase. A comparação com controles saudáveis também mostrou discreta diminuição de número de

mitocôndrias no THB I, mas em só um dos marcadores, o DNAmT. É possível que a neurobiologia do subtipo II possibilite a preservação do número de mitocôndrias, por ser menos grave. Isso seria coincidente com a diminuição de expressão de genes mitocondriais em células linfoblastóides somente em pacientes com THB I, mas não no THB II (Washizuka et al., 2005). Além disso, a apresentação clínica mais branda do subtipo II do THB reforça a hipótese.

O presente estudo não mostrou alteração de níveis de NO em pacientes com THB em fase inicial. Embora seja possível argumentar que o achado negativo se deva ao estágio inicial em que os pacientes se encontravam, é importante também recordar que o NO tem propriedades neuromoduladoras e neuroprotetoras quando presente em quantidades fisiológicas e não é necessariamente nocivo (Calabrese et al., 2007).

6.2. Efeito do tratamento com lítio

Observou-se um efeito do lítio deste estudo com potencial para neuroproteção. O tratamento com lítio diminuiu a peroxidação lipídica (medida pelo TBARS) e diminuiu a atividade da SOD nos pacientes com depressão bipolar, bem como aumentou a atividade da cadeia transportadora de elétrons e os níveis de NO (Figura 6).

Figura 6. Modelo proposto para a ação neuroprotetora do lítio no Transtorno de Humor Bipolar (THB). O lítio aumenta a atividade da cadeia transportadora de elétrons e diminui a atividade da superóxido dismutase no THB, gerando assim diminuição do estresse oxidativo. O lítio também aumenta os níveis do neuromodulador óxido nítrico.

O lítio aumentou a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Pode ser que o aumento na eficácia do complexo I esteja associado à diminuição de estresse oxidativo observada aqui nos pacientes com depressão bipolar, já que o contrário se observa: discretas diminuições na atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons estão associadas ao aumento de estresse oxidativo em diversos estudos (Adam-Vizi, 2005). A regulação da enzima SOD pelo tratamento com lítio é uma outra possível explicação para a diminuição do estresse oxidativo observada no presente estudo; uma melhora do equilíbrio das enzimas antioxidantes se mostrou eficaz contra o estresse oxidativo (Andreazza et al., 2007).

Pode ser que uma ação antioxidante do lítio seja favorecida por alguma especificidade da neurobiologia do subtipo II do THB. Depois do tratamento com lítio houve diminuição de peroxidação lipídica somente no subtipo II, mas não no subtipo I do THB. Além disso, em comparação com o subtipo I, os pacientes com subtipo II do THB mostraram aumento de citrato sintase e conteúdo de DNAm, ambos marcadores do número de mitocôndrias. Um número maior de mitocôndrias poderia favorecer uma melhor ação do lítio contra a peroxidação lipídica no THB.

Coincidente com um efeito protetor antioxidante do lítio nos presentes resultados, achou-se também um aumento de NO na depressão bipolar. O NO tem sido sugerido como molécula importante para neuroproteção e para a fisiologia normal em doses não-tóxicas (Calabrese et al., 2007). O NO se mostrou capaz de modular o ácido gama-aminobutírico, que tem evidências de transmissão diminuída no THB (Guidotti et al., 2011). Houve aumento da liberação de ácido gama-

aminobutírico em resposta ao NO em cultura de neurônios de camundongos (Ohkuma et al., 1996) e em cérebro de ratos *in vivo* (Getting et al., 1996).

6.3. Limitações e pontos fortes

São limitações deste estudo o tamanho da amostra, a presença de pacientes somente em fase depressiva, bem como o fato de a maior parte dos pacientes ter o subtipo II do THB. Por outro lado, o início recente do THB, o fato de a maioria dos pacientes não estar medicados (84%) e a maior parte dos pacientes ser virgem de tratamento (71%) são fatores que aumentam a especificidade do presente estudo, evitando algumas influências na neurobiologia que poderiam interferir nos parâmetros estudados.

6.4. Conclusão e perspectivas

O presente estudo sugere que possa haver um perfil específico de alterações em fases iniciais do THB, com a presença de mecanismos compensatórios, reforçando a proposta de investigar o estadiamento neurobiológico no THB. A expectativa otimista é de que o estadiamento permita intervenções iniciais mais amplas que melhorem o curso do THB e o prognóstico (Berk et al., 2013).

Estudos avaliando coortes de pacientes com THB com medidas repetidas de biomarcadores são necessários para a confirmação dos achados no THB de início recente e para esclarecer o curso do estresse oxidativo e da função mitocondrial nos diferentes estágios do THB.

Os achados sugerem que o papel da mitocôndria na neurobiologia dos subtipos I e II do THB possa ser diferente e que o papel do lítio contra o estresse oxidativo

possa ser diferente nos dois subtipos. Estudos com amostras maiores poderiam confirmar estes achados preliminares.

Os achados reforçam um papel do lítio contra o estresse oxidativo, sugerindo que a droga atue em humanos aumentando a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de forma dose-dependente e possa regular as enzimas antioxidantes em humanos. Além disso, os presentes resultados sugerem que o lítio possa modular o sistema nitrérgico no THB.

7. ANEXOS

7.1. Artigos publicados

7.1.1. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder

Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder

Rafael T. de Sousa^a, Miyuki Uno^b, Marcus V. Zanetti^{a,c,d}, Sueli M.O. Shinjo^b, Geraldo F. Busatto^{c,d}, Wagner F. Gattaz^{a,c}, Sueli K.N. Marie^b, Rodrigo Machado-Vieira^{a,c,*}

^a Laboratory of Neuroscience, LIM-27, Institute and Department of Psychiatry, University of São Paulo, Brazil

^b Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of São Paulo, Brazil

^d Laboratory of Psychiatric Neuroimaging, LIM-21, Department and Institute of Psychiatry, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2013

Received in revised form 4 September 2013

Accepted 5 September 2013

Available online 13 September 2013

Keywords:

Antidepressant

Bipolar disorder

Depression

Lithium

Mitochondria

Treatment

ABSTRACT

Background: Evidence supports the role for mitochondrial impairment in the pathophysiology of bipolar disorder (BD). BD has been associated with decreased mitochondrial electron transport chain activity and increased oxidative stress. Also, mitochondrial DNA (mtDNA) encodes mitochondrial electron transport chain proteins and has been associated with altered oxidative stress. Preclinical studies showed that lithium treatment increased mtDNA content, but no study has directly assessed mtDNA content in subjects with BD in vivo. Also, the effects of lithium treatment on mtDNA content have never been evaluated in humans.

Methods: Leukocyte mtDNA content using real time-PCR was evaluated in subjects with BD ($n = 23$) in a depressive episode (≥ 18 in the 21-item Hamilton Depression Rating Scale) before and after 6-week lithium treatment versus healthy controls ($n = 24$).

Results: mtDNA content showed no significant difference between subjects with BD at baseline and controls ($p = 0.46$); also no difference was observed when comparing before and after lithium treatment. A trend for decreased mtDNA content was specifically observed in BD type I compared to controls and BD type II ($p = 0.05$). Importantly, endpoint mtDNA copy number was significantly correlated with age.

Conclusion: In BD subjects who were younger, unmedicated and had a shorter duration of illness, no change was observed in mtDNA copy number. More studies with larger samples are warranted to evaluate mtDNA content changes in BD and its potential role as a treatment target, especially in BD type I and its association with aging.

Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Evidences of different lines support a role of mitochondrial impairment in the pathophysiology of bipolar disorder (BD) (Clay et al., 2011). Mitochondrial dysfunction was initially suggested in subjects with BD based on brain magnetic resonance spectroscopy studies showing energy shortage and low intracellular pH (Stork and Renshaw, 2005). Also, increased oxidative stress was found in the periphery and post-mortem brains of subjects with BD (Andreazza et al., 2008, 2010), reinforcing the mitochondrial dysfunction in the illness. Post-mortem studies in BD have also found decreased expression of genes encoding mitochondrial electron transport chain (ETC) (Konradi et al.,

2004; Sun et al., 2006) and lower mitochondrial ETC complex I activity (Andreazza et al., 2010).

The mtDNA is a double-stranded, closed circular molecule located in mitochondrion, encoding 37 genes essential for normal mitochondrial functioning. Abnormal mtDNA number content has been associated with disturbed mitochondrial function and increased oxidative stress (Malik and Czajka, 2013). In BD, only one post-mortem study found subtle changes in mtDNA (Vawter et al., 2006), while others found no differences compared to controls (Kakiuchi et al., 2005; Sabuncian et al., 2007; Torrell et al., 2013). Importantly, a study of elderly patients showed decreased mtDNA content associated with depressive symptoms (Kim et al., 2011). Lithium is a gold standard treatment for mood episodes and maintenance in BD (Machado-Vieira et al., 2009). Current guidelines recommend the use of lithium as a first line treatment for acute bipolar depression (Haeberle et al., 2012; Yatham et al., 2013). Also, data from the European drug surveillance program shows that lithium is the most prescribed agent for bipolar depression in combined therapy (33%) (Haeberle et al., 2012).

Its efficacy has been associated with the mtDNA 10398A polymorphism (Washizuka et al., 2003). Also, Struwing et al. (2007) found

Abbreviations: BD, Bipolar disorder; CGI, Clinical Global Impression; ETC, electron transport chain; HAM-D, 21-item Hamilton Depression Scale; Hb, Hemoglobin Beta; mtDNA, mitochondrial DNA; SCID, Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders; YMRS, Young Mania Rating Scale.

* Corresponding author at: Institute and Department of Psychiatry, University of São Paulo, Rua Ovidio Pires de Campos, 785, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: machadovieira@gmail.com (R. Machado-Vieira).

lithium increasing mtDNA content and in spinal cord of rodents. Since mtDNA encodes part of complex I proteins, lithium may enhance mtDNA content and lead to altered complex I transcription, observed in the mitochondrial complex I *NDUFS7* gene in subjects with BD treated with lithium (Sun et al., 2006).

Up to date, no study has assessed mtDNA content in subjects with BD in vivo, nor examined mtDNA content association with depressive symptoms in BD. Furthermore, no study evaluated lithium effects in mtDNA content in humans and its potential clinical relevance. The present study evaluates mtDNA content in bipolar depressive episodes compared to healthy controls, testing if leukocyte mtDNA content is altered in BD or modulated by lithium over time (6 weeks) in a clinically relevant paradigm.

2. Methods

2.1. Subjects

Between August 2010 and June 2012, 23 outpatients, 17 (73.9%) women, with a mean age of $28.5 (\pm 6.1)$ years and a diagnosis of BD, currently experiencing a depressive episode, as diagnosed by Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders (SCID) (First, 1995), entered the study. Patients were recruited through newspaper, internet and radio advertisement and evaluated at the Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil.

Patients who presented a score ≥ 18 on the 21-item Hamilton Depression Scale (HAM-D) were eligible for the study. Diagnosis and psychometric assessments were performed by experienced psychiatrists. Presence of any current neurological disorders or medical illness, other axis I diagnosis (including current substance abuse or dependence) or mental retardation was excluded from the present investigation.

Twenty-four age-matched (± 3 years) healthy controls recruited through advertisement in the community, 14 (58.3%) men and 10 (41.7%) women (mean age = 28.3 ± 7.3 years), were also studied. Controls were interviewed and excluded if they had a lifetime history of any mental disorder (as assessed with the SCID), including substance abuse/dependence or any neurological/medical disease or any first-degree relative with mood or psychotic disorder. This study was approved by the local institutional review board, and all participants provided written informed consent before entering the study.

2.2. Study design

Blood samples were collected at baseline and at endpoint (week 6), while healthy controls had only one-point sample collection. At baseline, patients were started on lithium carbonate at 450 mg/day, with flexible dose adjusted according to clinical improvement, also controlling plasma lithium levels. Most patients were in lithium monotherapy, although hypnotic use as needed was allowed and 2 patients were also in use of other drugs. Psychometric assessments were made at baseline, on week 1, week 2, week 4, and week 6 (endpoint). Assessment of symptoms was performed with HAM-D, Young Mania Rating Scale (YMRS), and Clinical Global Impression (CGI) – Severity and Improvement. Clinical response was defined as a decrease of 50% or more in the HAM-D at endpoint and remission as HAM-D < 8 and YMRS < 8 at endpoint.

2.3. Assays

Blood samples were collected from 8 to 10 am from subjects who were in 8-hour fasting. Samples were centrifuged at 20°C and $700 \times g$ for 40 min and leukocyte pellets were obtained. PBS and DMSO were added to the pellet and the samples were gradually frozen at -10°C for 30 min, at -20°C for 30 min, and finally stored at -80°C . DNA was extracted from leukocyte pellet following the protocol described by Kit QIAamp® DNA Mini (Qiagen Inc., Hilden, Germany). DNA quality was verified in agarose gel electrophoresis and DNA concentrations were

determined at 260 nm wavelength using ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.). Ratios between 1.8 and 2.0 at 260/280 nm were considered satisfactory. The mtDNA copy number was determined with quantitative real-time PCR, using 2.5 ng from total DNA extracted. A nuclear, single copy gene, *Hemoglobin Beta* (*HBb*) was used as reference (Kersting et al., 2004). Primer sequences used at a final concentration of 100 nM on ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA) were (5'–3'): mtDNA F: CCTAGCCGTTTACTCAATCT, mtDNA R: TGATGGCTAGGGTGACTT CAT, *HBb* F: GTGAAGGCTCATGGCAAGA, and *HBb* R: AGCTACTCAGTG TGGCAAG (IDT, Coralville, IA, USA). Reaction conditions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 15 s at 95°C , and 1 min at 60°C . All assays were carried out in duplicate. mtDNA copy number was calculated by the equation $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

2.4. Statistics

Statistical analysis was performed using SPSS 14.0 and “R” package. Chi-square test was used to compare gender in patients and controls. For samples with normal distribution Student's *t* test was used and when samples had non-normal distribution, comparisons were performed with Mann–Whitney and Wilcoxon Signed Ranks tests, and correlations evaluated with Spearman test. For comparing patients and controls generalized linear model was performed to take gender difference into account. Significance level was set at <0.05 (two-tailed).

3. Results

3.1. Demographic and clinical data

Demographic and clinical data of patients and controls are summarized in Table 1. From 23 patients enrolled, 7 (30.4%) had a diagnosis of BD type I and 16 (69.6%) of BD type II; 21 (91.3%) patients were medication-free for at least 6 weeks prior to their enrollment in the study and 16 (69.6%) were drug-naïve. Patients had mean duration of illness of 36.3 months (± 18.2) and history of previous mood episode with psychosis was present in 4 (17.4%) patients. Patients had a significant decrease in depressive symptoms measured by HAM-D from baseline (22.0 ± 2.7) to endpoint (7.6 ± 6.4) ($z = -4.07$, $p < 0.001$).

Table 1

Demographic and clinical characteristics of bipolar depression patients and healthy controls.

	Controls (n = 24)	Bipolar (n = 23)	p
Gender			
Male/female, n (%)	14 (58.3)/10 (41.7)	6 (26.1)/17 (73.9)	0.01 ^a
Age, years	28.3 (± 7.3)	28.5 (± 6.1)	0.61 ^b
Bipolar disorder type			
Type I/type II, n (%)		7 (30.4)/16 (69.6)	
Duration of illness, months		36.3 (± 18.2)	
Drug-naïve, n (%)		16 (69.6)	
Medication-free, n (%)		21 (91.3)	
History of psychosis, n (%)		4 (17.4)	
HAM-D			
Baseline/endpoint		22.0 (± 2.7)/7.6 (± 6.4)	
YMRS			
Baseline/endpoint		5.6 (± 4.8)/4.7 (± 9.7)	
Response, n (%)		18 (78.3)	
Remission, n (%)		13 (56.6)	
Dropout, n (%)		1 (4.3)	
Endpoint serum lithium, mEq/L		0.50 (± 0.20)	

HAM-D – Hamilton Depression Scale, YMRS – Young Mania Rating Scale.

^a Significantly different.

^b Chi-square.

^c Student's *t* test.

Fig. 1. Comparison of mitochondrial DNA (mtDNA) copies in healthy controls, bipolar disorder (BD) patients before and after 6-week lithium treatment.

Eighteen (78.3%) patients responded to treatment and 13 (56.6%) patients had remission.

3.2. mtDNA copy number in subjects with BD and controls

Subjects with BD and healthy controls had a gender difference, but on the model comparing patients and controls gender was not associated with mtDNA copies ($t = -0.52$, $p = 0.61$). Even taking gender into account on the model, subjects with BD and controls did not differ regarding to mtDNA copies (BD patients = 1241.9 ± 1671.4 ; healthy controls = 914.2 ± 640.0) ($t = 0.75$, $p = 0.46$) (Fig. 1). Baseline HAM-D scores and mtDNA copies did not show a significant correlation ($\rho = 0.27$, $p = 0.21$).

There was a non-significant decrease in mtDNA copies of type I BD group (490.5 ± 421.5) in comparison to healthy controls (914.2 ± 640.0) ($z = -1.937$, $p = 0.05$). No differences were observed in mtDNA copies between patients with type II BD and healthy controls ($z = -0.44$, $p = 0.66$). Also, a non-significant decrease in mtDNA copies of type I BD (490.5 ± 421.5) compared to type II BD (1570.7 ± 1909.8) was observed ($z = -1.938$, $p = 0.05$).

Number of mtDNA copies at baseline associated with treatment status at baseline (drug naïve $z = -0.64$, $p = 0.53$; drug-free $z = -0.46$, $p = 0.65$) and the presence psychosis history ($z = -1.46$, $p = 0.14$). Also, baseline mtDNA copies were not correlated with any of the variables analyzed: age, CGI score, and duration of illness (data not shown).

3.3. Lithium treatment did not change mtDNA copies (but was correlated with age)

Lithium treatment did not change mtDNA copies from baseline (1241.9 ± 1671.4) to endpoint (1010.0 ± 810.6) ($z = -0.50$, $p = 0.62$) (Fig. 1). mtDNA copies at endpoint were not different between responders vs. non-responders ($z = -0.68$, $p = 0.50$) or remitters vs. non-remitters ($t = 0.25$, $p = 0.80$). Also, endpoint mtDNA copy number was significantly correlated with age ($\rho = -0.564$, $p = 0.006$), but not with any other variable analyzed: endpoint HAM-D, CGI score, and duration of illness (data not shown).

4. Discussion

The present study found no difference in mtDNA copy number between subjects with BD depression and healthy controls. Also, mtDNA content did not significantly change after 6-week lithium treatment. However, a significant association with endpoint mtDNA copy number was significantly correlated with age.

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating mtDNA content in vivo in subjects with BD (in any mood state) and also the only investigation on lithium effects at mtDNA content in humans.

The evidence of mitochondrial dysfunction in BD comes from different lines of research, including reduced high-energy phosphates and low pH in neuroimaging of BD patients (Stork and Renshaw, 2005) as well increased prevalence of mtDNA polymorphisms and changes in mitochondrial function in microarray and biochemical studies of subjects with BD compared to healthy subjects (Clay et al., 2011; Quiroz et al., 2008). Based on studies showing increased oxidative stress in BD (Andreazza et al., 2008, 2010; Machado-Vieira et al., 2007) and decreased mitochondrial ETC activity (Andreazza et al., 2010), also associated with mtDNA content alteration (Malik and Czajka, 2013), we hypothesized that altered mtDNA content in BD patients would occur; however this finding was not observed here.

The present findings do not contradict evidences of mitochondrial dysfunction in BD. Although mtDNA encodes ETC proteins which lower its transcription in BD (Konradi et al., 2004; Sun et al., 2006), evidence challenges the association between mtDNA content and mtDNA transcription (Torrell et al., 2013; Vawter et al., 2006). Rather, it is possible that mtDNA sequence plays a more crucial role in mtDNA expression (Reinecke et al., 2009). Moreover, oxidative stress may only initially increase (reactive) mtDNA content (Liu et al., 2003), while longer periods of elevated oxidative stress are associated with a decrease in mtDNA content (Malik and Czajka, 2013), which may explain the here observed lack of alteration in mtDNA copy number.

The present results are in accordance with three studies in BD post-mortem brains which showed no alteration in mtDNA content (Kakiuchi et al., 2005; Sabuncian et al., 2007; Torrell et al., 2013). In contrast with our findings, one study found that mtDNA content slightly increased in post-mortem BD subjects (Vawter et al., 2006). The mtDNA content in peripheral cells may reflect similar mtDNA content in other targets (such as brain) involved different diseases (Malik and Czajka, 2013), which reinforces the validity of our findings in leukocytes.

Regarding mtDNA in peripheral cells, Kim et al. (2011) found decreased mtDNA content in leukocytes of patients with depression. Their study, however, did not use any diagnostic tool. Moreover, Kim et al. (2011) evaluated elderly patients with depressive symptoms while our sample comprised young adults with bipolar depression. Our study used standard tools for diagnosis and symptom evaluation, enhancing the validity of the findings.

Here, subjects with BD treated with lithium showed no changes in mtDNA content in bipolar depression. Present findings are in contrast with increased mtDNA content found in bovine endothelial cells incubated with lithium (Struwing et al., 2007) and in spinal cord of mice treated with lithium (Fornai et al., 2008). In humans, lithium might have no effect in mtDNA content regulation, especially in younger age.

Our findings showed a slight decrease in baseline mtDNA content in type I BD compared to controls ($p = 0.05$) and a small reduction in baseline mtDNA of type I BD compared to type II BD ($p = 0.05$). Indeed, most studies in mitochondria report data on BD type I while the present sample consisted in majority of BD type II subjects (69.6%). A difference in mitochondrial role in the neurobiology of these two subtypes is supported by Washizuka et al. (2005). They found differential expression of mitochondrial genes only in BD type I but not II. The presence of most BD type II here might explain the lack of alteration found in mtDNA content of BD patients.

Regarding potential limitations, the small BD sample size may limit the extrapolation of the present findings. However, the drug-naïve/drug status of most part of the sample at baseline strengthens the findings. Also, this is the first study evaluating mtDNA content in bipolar depression and lithium effects on mtDNA content. Importantly this study only includes unmedicated young subjects with BD short course of the illness, reinforcing the specificity of the findings.

Further studies with larger samples are warranted to assess mtDNA content in BD, especially in BD type I and its association with aging and illness progression.

Acknowledgments

This study was sponsored by Sao Paulo Research Foundation (Fapesp, Brazil). The Laboratory of Neuroscience is supported by the Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS).

References

- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* 2008;111:135–44.
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2010;67:360–8.
- Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:311–24.
- First M. Structured clinical interview for DSM-IV Axis I disorders. Patient ed. New York: Biometrics Research Department, New York Psychiatric Institute; 1995.
- Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsichenko O, Ferrucci M, Manca ML, et al. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2052–7.
- Haerle A, Greil W, Russman S, Grohmann R. Mono- and combination drug therapies in hospitalized patients with bipolar disorder. Data from the European drug surveillance program AMSP. *BMC Psychiatry* 2012;12:153.
- Kakiuchi C, Ishiwata M, Kametani M, Nelson C, Iwamoto K, Kato T. Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletions in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005;8:515–22.
- Kersting C, Tidow N, Schmidt H, Liedtke C, Neumann J, Boecker W, et al. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest* 2004;84:582–7.
- Kim MY, Lee JW, Kang HC, Kim E, Lee DC. Leukocyte mitochondrial DNA (mtDNA) content is associated with depression in old women. *Arch Gerontol Geriatr* 2011;53:e218–21.
- Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:300–8.
- Liu CS, Tsai CS, Kuo CL, Chen HW, Lii CK, Ma YS, et al. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res* 2003;37:1307–17.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Vale CL, Zanatto V, Cereser V, Silva Vargas R, et al. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 2007;421:33–6.
- Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord* 2009;11:92–109.
- Malik AN, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* 2013;13:481–92.
- Quiroz JA, Gray NA, Kato T, Manji HK. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:2551–65.
- Reinecke F, Smeitink JA, van der Westhuizen FH. OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:1113–21.
- Sabuncian S, Kirches E, Krause G, Bogerts B, Mawrin C, Llenos IC, et al. Quantification of total mitochondrial DNA and mitochondrial common deletion in the frontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *J Neural Transm* 2007;114:665–74.
- Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry* 2005;10:900–19.
- Struwing IT, Barnett CD, Tang T, Mao CD. Lithium increases PGC-1alpha expression and mitochondrial biogenesis in primary bovine aortic endothelial cells. *FEBS J* 2007;274:2749–65.
- Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2006;31:189–96.
- Torrell H, Montaña E, Abasolo N, Roig B, Gaviria AM, Vilella E, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013;162B:213–23.
- Vawter MP, Tomita H, Meng F, Bolstad B, Li J, Evans S, et al. Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state: implications for brain disorders. *Mol Psychiatry* 2006;11:663–79.
- Washizuka SA, Ikeda A, Kato N, Kato T. Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2003;6:421–4.
- Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Tajima O, Akiyama T, Kato T. Expression of mitochondria-related genes in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2005;7:146–52.
- Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT. guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar Disord* 2013;15:1–44.

7.1.2. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium

Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium

Rafael T. de Sousa^a, Carlos A. Zarate Jr.^b, Marcus V. Zanetti^{a,c}, Alana C. Costa^a, Leda L. Talib^a, Wagner F. Gattaz^{a,c}, Rodrigo Machado-Vieira^{a,b,c,*}

^a Laboratory of Neuroscience, LIM-27, Institute and Department of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil

^b Experimental Therapeutics and Pathophysiology Branch (ETPB), National Institute of Mental Health, NIH, Bethesda, MD, USA

^c Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2013

Received in revised form

8 November 2013

Accepted 26 November 2013

Keywords:

Oxidative stress

Lithium

Bipolar Disorder

Depression

Neuroprotection

ABSTRACT

Background: Several studies have described increased oxidative stress (OxS) parameters and imbalance of antioxidant enzymes in Bipolar Disorder (BD) but few is know about the impact of treatment at these targets. However, no study has evaluated OxS parameters in unmedicated early stage BD and their association with lithium treatment in bipolar depression.

Methods: Patients with BD I or II ($n = 29$) in a depressive episode were treated for 6 weeks with lithium. Plasma samples were collected at baseline and endpoint, and were also compared to age-matched controls ($n = 28$). The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) activities were measured.

Results: Subjects with BD depression at baseline presented a significant increase in CAT ($p = 0.005$) and GPx ($p < 0.001$) levels, with lower SOD/CAT ratio ($p = 0.001$) and no changes on SOD or TBARS compared to healthy controls. Regarding therapeutics, lithium only induced a decrease in TBARS ($p = 0.023$) and SOD ($p = 0.029$) levels, especially in BDII. Finally, TBARS levels were significantly lower at endpoint in lithium responders compared to non-responders ($p = 0.018$) with no difference in any biomarker regarding remission.

Conclusion: The present findings suggest a reactive increase in antioxidant enzymes levels during depressive episodes in early stage BD with minimal prior treatment. Also, decreased lipid peroxidation (TBARS) levels were observed, associated with lithium's clinical efficacy. Overall, these results reinforce the role for altered oxidative stress in the pathophysiology of BD and the presence of antioxidant effects of lithium in the prevention of illness progression and clinical efficacy.

Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

It has been proposed a progressive course of Bipolar Disorder (BD) associated with longer illness duration, cognitive decline, decreased functioning and impaired cellular resilience leading to deleterious consequences on signal transduction and synaptic plasticity (Machado-Vieira et al., 2013). Thus, intervention in the early stage of BD may be a valuable tool to improve the course of the illness and provide a better prognosis (Berk et al., 2013).

* Corresponding author. Institute and Department of Psychiatry, School of Medicine, Rua Ovidio Pires de Campos, 785, CEP 01060-970 Sao Paulo, SP, Brazil.

E-mail addresses: machadovieira@gmail.com, machadovieira@mail.nih.gov (R. Machado-Vieira).

Increased Oxidative Stress (OxS) generates deleterious consequences on signal transduction, synaptic plasticity, and cellular resilience, especially by inducing lipid peroxidation in membranes, proteins and DNA (Grintzalis et al., 2013; Mahadik et al., 2001; Soeiro-de-Souza et al., 2013). DNA damage, which can be induced by oxidative stress, has been found to be associated with the severity of depressive symptoms in BD (Andreazza et al., 2007b).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels are a direct index of cell lipid peroxidation whereas antioxidant system involves coordinated effects of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) (Reddy et al., 1991).

Imbalance in antioxidant enzymes has been reported in several studies of BD and is consistently associated with increased OxS

(Andreazza et al., 2008). Only one study evaluated OxS parameters in BD patients with short duration of illness and found increased activity of antioxidant system in mania (Machado-Vieira et al., 2007). No study, however, has evaluated OxS in recent-onset BD patients in unmedicated depressive episodes.

Also, consistent evidences support the role of a subtle mitochondrial compromise in BD (Clay et al., 2011; Manji et al., 2012). Initially, magnetic resonance spectroscopy studies showed increased lactate levels in BD, suggesting a metabolic shift (reviewed in Stork and Renshaw, 2005). Post-mortem studies using brains of BD patients have shown decreased expression of mitochondrial electron transport chain genes (Konradi et al., 2004; Sun et al., 2006). Mitochondrial dysfunction increases production of reactive oxygen species, leading to enhanced OxS. OxS parameters have been found to be increased in BD post-mortem brains (Andreazza et al., 2010) and also in the peripheral blood of subjects with BD (Andreazza et al., 2008). Only one study evaluated subjects with BD during a depressive episode in a smaller sample, and found a slight increase in CAT levels compared to controls (Andreazza et al., 2007a).

Evidence suggests that the presence of OxS might be associated with the consistently found hyperactivation of the glutamatergic and dopaminergic systems in BD (Berk et al., 2011). Glutamatergic hyperactivity leads to increased calcium influx (Plein and Berk, 2001) which increases OxS (Shao et al., 2005). On the other hand, enhanced OxS has been suggested to increase glutamate (Lovell et al., 2000; Volterra et al., 1994). The excessive dopamine production increases OxS due to the production of reactive oxygen species in dopamine metabolism (Miyazaki and Asanuma, 2008). Moreover, the opposite mechanism also happens when OxS induces dopamine uptake, thus increasing dopamine activity (Kim and Andreazza, 2012) in a vicious cycle.

Other systems associated with BD are γ -Aminobutyric acid (Brambilla et al., 2003) and serotonergic systems (Fountoulakis et al., 2012), which are found to show decreased activity. Similar to other systems, OxS is associated with decreased γ -Aminobutyric acid release (Palmeira et al., 1993). Increased metabolism of serotonin, which decreases serotonergic function, is found to be associated with increased oxidative stress (Bianchi et al., 2005; Nocito et al., 2007). Consistent with these findings, evidences suggest that treatment with antidepressants can decrease OxS (Bilici et al., 2001).

Lithium is recommended as a first-line treatment for bipolar depression (Haerberle et al., 2012; Yatham et al., 2013) and it has shown several neuroprotective and neurotrophic actions (Machado-Vieira et al., 2009). Lithium has been shown to increase brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (de Sousa et al., 2011), regulate intracellular Ca^{+2} (Wasserman et al., 2004), activate CREB (Ozaki and Chuang, 1997), increase Akt (Yazlovitskaya et al., 2006), and inhibit apoptotic caspase-3 (Ghribi et al., 2002). Similarly, lithium has been shown to protect against glutamatergic excitotoxicity (Nonaka et al., 1998). This agent has shown to decrease OxS in preclinical models (Schäfer et al., 2004), in bipolar mania (Machado-Vieira et al., 2007) and healthy volunteers (Khairova et al., 2012). Nonetheless, the effects of lithium on OxS parameters specifically in bipolar depression have never been studied.

The present study evaluated OxS parameters (TBARS, SOD, CAT and GPx) in unmedicated bipolar depression versus controls as well as the potential antioxidant effects of lithium in a therapeutically relevant paradigm. Our hypothesis was that subjects in a bipolar depression episode would present increased OxS (TBARS) and imbalance of antioxidant enzymes during depressive episodes and that lithium would lower OxS levels and enhance antioxidant enzymes levels.

2. Methods

2.1. Subjects

Subjects were evaluated between August 2010 and June 2012 at the Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil. Twenty-nine patients, 21 (72.4%) women, with $28.4 (\pm 5.5)$ years of age and diagnosis of BD I (38%) or BD II (62%) in a depressive episode were included, as diagnosed by the Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders (SCID) (First et al., 1995). Patients who had a score ≥ 18 on the 21-item Hamilton Depression Scale (HAM-D) (HAMILTON, 1960) were eligible for the study. Also, 26 (89.6%) patients were drug-free for at least 6 weeks prior to their enrollment and 21 (72.4%) subjects were treatment-naïve at baseline. Exclusion criteria included presence of chronic medical illness, comorbid substance abuse or dependence in the past year, rapid cycling in the past 12 months, previous head trauma, current major axis I psychiatric disorder, subjects submitted to electroconvulsive therapy and current significant abnormal laboratory tests.

The comparison group was constituted by 28 age-matched healthy controls (within 3 years of difference of BD patients); these 16 men (57.1%) and 12 women (42.8%) ($\text{age} = 28.0 \pm 7.2$) were recruited through advertisement in the local community. Controls were excluded if they had lifetime history of any mental disorder (by SCID), including substance abuse or dependence, or if they had any disease with central nervous system involvement or any first-degree relative with a mental disorder. This study was approved by the local institutional review board, and all participants provided written informed consent before study entry.

2.2. Study design

Patients had blood samples collected at baseline and at endpoint (week 6), while healthy controls had only one-point sample collection. At baseline, patients were started on open-label lithium carbonate at 450 mg/day, with flexible doses increase according to clinical improvement, controlling plasma lithium levels to ensure compliance and avoid toxicity (< 1.2 mEq/L).

Most patients were on lithium monotherapy, although hypnotic (benzodiazepine or zolpidem) use as needed was allowed and 4 patients were also in use of antipsychotics or mood stabilizer. Psychometric assessments were made at baseline and on week 1, week 2, week 4, and week 6 (endpoint). Assessment of symptoms was performed with the HAM-D, Young Mania Rating Scale (YMRS) (Young et al., 1978), and Clinical Global Impression. Clinical response was defined as a decrease of 50% or more in the HAM-D at endpoint and remission as $\text{HAM-D} < 8$ and $\text{YMRS} < 8$ at endpoint.

2.3. Assays

Blood samples were collected from 8:00 to 10:00 AM using vacutainer tubes. All subjects were in 8-h fasting. Samples were centrifuged at 20°C and $1620 \times g$ for 15 min. Plasma was obtained, frozen, and stored at -80°C . Given the complexity of the study, not all the patients and controls had samples available to be included in all analyses. All samples were assessed in duplicate. TBARS levels (malondialdehyde – thiobarbituric acid adduct) and SOD, CAT, and GPx activities were determined using spectrophotometry according to commercially available kits from Cayman Chemical Company®. Since SOD and CAT act sequentially, the results are also expressed as SOD/CAT ratio. CAT and GPx levels are presented as nM/min/mL, SOD as U/mL and TBARS as nM/mL.

2.4. Statistics

Student's *t* test and Mann–Whitney test were used for intra-group comparisons with normal and non-normal distributions of variables, respectively. Changes in OxS measures and enzyme activities before and after lithium treatment in the BD group were compared using paired student's *t* test and Wilcoxon signed ranks test. Kruskal–Wallis and ANOVA were used to compare two subgroups of patients with controls. Significance level was set at <0.05 (two-tailed). Statistical analysis was performed using the SPSS 14.0 and last observation carried forward was used in one patient who discontinued treatment.

3. Results

3.1. Clinical and demographical data

Demographic and clinical data are summarized in Table 1; patients and controls showed similar age, but a trend for different gender distribution ($p = 0.05$). Patients had a significant decrease in depressive symptoms measured by HAM-D from baseline (22.5 ± 3.5) to endpoint (7.3 ± 5.9) ($z = -4.68$, $p < 0.001$). Twenty-five (86.2%) patients responded to treatment and 18 (62.1%) achieved symptomatic remission at week 6. Mean duration of illness was 3.0 years (± 1.6).

3.2. Antioxidant enzymes are imbalanced in drug-free bipolar depression compared to controls

TBARS levels in BD patients at baseline ($n = 29$) and controls ($n = 22$) were not different ($p = 0.95$) (Fig. 1A) (Table 2). Baseline SOD levels in BD patients ($n = 25$) and controls ($n = 28$) were similar ($p = 0.56$) (Fig. 1B). CAT was increased in BD patients ($n = 29$) in comparison to controls ($n = 22$) ($p = 0.005$) (Fig. 1C). SOD/CAT ratio ($n = 25$) in bipolar depression was decreased compared to controls ($n = 22$) ($p = 0.001$) (Fig. 1D). Finally, baseline GPx in subjects with BD ($n = 25$) was increased in comparison to controls ($n = 27$) ($t = 4.19$, $p < 0.001$) (Fig. 1E).

Since the BD and control groups had a trend for unbalance in gender, we compared OxS parameters of males versus females in

patients and then in controls to assure that the gender difference did not influence the results. After analyses (data not shown), the effects of gender difference in the sample did not influence in the results.

3.3. Lithium treatment decreases TBARS and SOD in bipolar depression

There was a significant decrease in TBARS from baseline to endpoint ($n = 28$, $p = 0.023$) (Fig. 1A) (Table 2). SOD activity decreased after lithium treatment ($n = 24$, $p = 0.029$) (Fig. 1B), while CAT levels did not show difference ($n = 28$, $p = 0.85$) (Fig. 1C). SOD/CAT ratio at endpoint showed no difference from baseline ($n = 24$, $p = 0.48$) (Fig. 1D). GPx levels were not different from baseline after lithium treatment ($n = 24$, $t = 0.47$, $p = 0.64$) (Fig. 1E).

3.4. TBARS at endpoint was decreased in responders compared to non-responders at endpoint

At endpoint, TBARS was decreased in responders (31.4 ± 32.9) compared to non-responders (76.7 ± 30.2) ($p = 0.018$) (Fig. 2A), although endpoint TBARS values from remitters ($n = 18$, 30.5 ± 32.7) and non-remitters ($n = 10$, 51.2 ± 39.1) showed no significant difference ($p = 0.14$). There was no association between any other biological measure with response or remission (data not shown). Finally, lithium levels showed no association with any marker at endpoint (data not shown).

3.5. BD II but not BD I patients showed decrease in TBARS after lithium treatment

A selective decrease of TBARS in BD II (58.63 ± 46.23 nM/mL) to endpoint (29.14 ± 31.86 nM/mL) was observed ($n = 18$, $p = 0.039$), whereas in BD I, TBARS showed no alteration from baseline (67.86 ± 46.06 nM/mL) to endpoint (53.62 ± 38.87 nM/mL) ($n = 10$, $t = 0.71$, $p = 0.50$). Endpoint TBARS in BD II was significantly decreased compared to endpoint TBARS in BD I ($p = 0.04$) (Fig. 2B). Other OxS parameters were not associated with BD subtype (data not shown).

4. Discussion

The present findings showed an imbalance of antioxidant enzymes in bipolar depression, with increased CAT and GPx and decreased SOD/CAT ratio in recent-onset drug-free subjects compared to healthy controls. Also, lithium significantly decreased plasma TBARS and SOD activity after 6 weeks of lithium treatment; importantly, TBARS levels at endpoint were associated with clinical response. TBARS decrease was only relevant in subjects with BD II. A number of different factors might contribute to the heterogeneity of results observed in the literature of OxS enzymes in BD (Kuloglu et al., 2002; Montero et al., 2012). Nevertheless, it has been suggested that enzymes imbalance is more associated with overall changes on OxS parameters than a specific alteration affecting a single protein (Andrades et al., 2005; Andreazza et al., 2007a).

We found increased CAT and GPx, and decreased SOD/CAT ratio in bipolar depression, which is consistent with imbalance and increased OxS found in other studies. Previously, our group found increased CAT activity in BD patients during drug naïve mania (Machado-Vieira et al., 2007). Only one study evaluated BD patients during a depressive episode (Andreazza et al., 2007a), but subjects were under diverse treatments and compared with other mood states. Other analyses comprised patients without depression or samples including symptomatic and asymptomatic patients and found decreased CAT levels (Andreazza et al., 2007a; Ozcan et al.,

Table 1
Demographic and clinical characteristics of bipolar disorder patients and healthy controls.

	Controls ($n = 28$)	Bipolar ($n = 29$)	<i>p</i>
Gender			
Male/Female, n (%)	16 (57.1)/12 (42.9)	8 (27.6)/21 (72.4)	0.05 ^a
Age, years	28.0 (± 7.2)	28.4 (± 5.5)	0.60 ^b
Bipolar Disorder type			
Type I/Type II, n (%)		11 (37.9)/18 (62.1)	
Mood Phase			
Depressive/mixed		27 (93.1)/2 (6.9)	
Duration of illness, years		3.0 (± 1.6)	
Drug-naïve, n (%)		21 (72.4)	
Drug-free, n (%)		26 (89.6)	
History of psychosis, n (%)		4 (13.8)	
HAM-D			
Baseline/endpoint		22.6 (± 3.6)/7.3 (± 5.9)	
YMRS			
Baseline/endpoint		6.1 (± 5.6)/3.8 (± 8.6)	
Response, n (%)		25 (86.2)	
Remission, n (%)		18 (62.1)	
Dropout, n (%)		1 (3.4)	
Endpoint serum lithium, mEq/L		0.49 (± 0.20)	

HAM-D – Hamilton Depression Scale, YMRS – Young Mania Rating Scale.

^aSignificantly different. a – Chi-square, b – Student's *t* test.

Fig. 1. OxS parameters in patients with bipolar disorder in a depressive episode before (black bar) and after lithium treatment (grey bar) compared to healthy controls (white bar): A) TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; B) SOD – Superoxide Dismutase; C) CAT – Catalase; D) SOD/CAT ratio, and E) GPx – Glutathione Peroxidase; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2004; Raffa et al., 2012; Ranjekar et al., 2003) or unaltered (Fontoura et al., 2012) in BD versus healthy subjects. Also, our finding of increased GPx levels in bipolar depression is in line with Andreazza et al. (2007a), while other studies did not find a significant difference in different mood states (Abdalla et al., 1986; Andreazza et al., 2009; Kuloglu et al., 2002; Raffa et al., 2012; Ranjekar et al., 2003). In spite of the fact that imbalance of antioxidant enzymes is an indicative of OxS present across mania, depression, and euthymia, BD studies do not suggest a specific antioxidant enzyme alteration associated with any mood phase.

Although the mechanisms underlying CAT and GPx balance are unclear, increases in CAT and GPx found here in early stage BD are compatible with a compensatory mechanism, proposed to be present in early stages of BD (Berk et al., 2013). Loss of neurotrophic support, increased oxidative stress and inflammation are associated with illness progression in BD (Berk et al., 2013). Oxidative stress and loss of neurotrophic support play key roles in the development of several neuropsychiatric disorders, including BD. Oxidative stress can down-regulate neurotrophic factors, while neurotrophic factors promote the expression of antioxidant proteins, also limiting inflammation.

The increases in CAT and GPx found in our study might explain the unaltered TBARS values found in our BD patients at baseline, in contrast with increased TBARS in most BD studies (Andreazza et al., 2008). Increases in CAT were also found in early stage BD during mania (Machado-Vieira et al., 2007). Importantly, CAT has shown efficacy against dopamine-induced OxS in mitochondria (isolated from) rat brain (Berman and Hastings, 1999) and in one study in SH-SY5Y neuroblastoma human cells (Lai and Yu, 1997) although not in

another study performed in the same cells (Emdadul Haque et al., 2003). Moreover, an elevation in GPx activity was the response to oxygen reactive species exposure in mice (Esposito et al., 1999). Glutathione, which antioxidant reactions are catalyzed by the enzyme GPx, was protective from dopamine-induced OxS in vitro (Kuhn et al., 1999), in SH-SY5Y neuroblastoma human cells (Emdadul Haque et al., 2003; Kuhn et al., 1999), and in rat striatum (Hastings et al., 1996). Regarding the glutamatergic system, glutathione decreased glutamatergic activity through reducing glutamate binding to glutamate receptors (Ogita et al., 1986; Varga et al., 1997). Also, our results showing decreased SOD/CAT ratio in BD patients relative to controls might be seen as compensatory, since decreased SOD/CAT ratio as well as increased CAT and GPx favors scavenge of the reactive oxygen species H_2O_2 (Gsell et al., 1995; Khairova et al., 2012). The role of CAT and GPx as markers of early stage bipolar depression warrants further investigation.

Regarding the effects of lithium on OxS parameters, it was observed a clinically relevant decrease in lipid peroxidation (TBARS) levels. Our findings are in line with previous studies showing lower TBARS levels in lithium treated BD after mania (Machado-Vieira et al., 2007) and euthymia (Banerjee et al., 2012). In the study of Banerjee et al. (2012), lithium's antioxidant effect was correlated with the activity of $Na^+-K^+-ATPase$ enzyme, pointing to a possible antioxidant mechanism of the drug. Thus, our results provide further support to the idea that lithium possesses an antioxidant effect.

Importantly, the response to lithium treatment was associated with decrease in TBARS levels. This finding reinforces the presence

Table 2

OxS parameters in bipolar disorder patients in a depressive episode before and after lithium treatment compared to healthy controls.

	Before treatment (n = 29)	After treatment (n = 28)	Healthy controls (n = 22)	Patients vs. controls p	Before vs. after treatment p
TBARS (nM/mL)	60.77 ± 45.14	37.88 ± 35.85	62.74 ± 37.58	0.95	0.023*
SOD (U/mL)	1.52 ± 0.23	1.38 ± 0.30	1.46 ± 0.45	0.56	0.029*
CAT (nM/min/mL)	21.59 ± 9.49	22.17 ± 12.70	5.96 ± 2.67	0.005**	0.85
SOD/CAT ratio	0.11 ± 0.11	0.15 ± 0.22	0.31 ± 0.17	0.001**	0.48
GPx (nM/min/mL)	70.32 ± 15.62	68.76 ± 19.53	49.91 ± 19.10	<0.001**	0.64

TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances, SOD – Superoxide Dismutase, CAT – Catalase, GPx – Glutathione Peroxidase, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fig. 2. A) Endpoint thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in responders compared with non-responders to lithium treatment. B) Endpoint TBARS levels in Bipolar Disorder I compared to Bipolar Disorder II; * $p < 0.05$.

of an association of central and peripheral levels of OxS markers, which also was previously suggested by studies in acute neurological disorders such as stroke (Polidori et al., 1998). The decrease in TBARS levels in responders compared to non-responders warrants further research to confirm TBARS as a marker of treatment efficacy.

Interestingly, TBARS decreased after lithium treatment only in subjects with BD II. Although BD I and BD II are associated with different clinical course and response to treatment, neurobiological differences between the two types of BD remain understudied (D'Addario et al., 2012; Huang et al., 2012). Lithium treatment also decreased SOD activity in our sample. A decrease in SOD was also observed in healthy subjects taking lithium (Khairova et al., 2012), reinforcing that its antioxidant profile may involve SOD activity, independently of disorder and treatment outcome. Since SOD catalyzes a dismutation reaction that converts superoxide in hydrogen peroxide (Liochev and Fridovich, 1999), SOD decrease could potentially lower hydrogen peroxide formation.

The study is limited by the lack of a randomized double-blind design, also lacking a second point blood collection for controls, gender unbalance between BD and control groups, and the relatively small sample size. Also, the absence of patients studied during mania and euthymia in the sample may limit the generalization of the findings to all phases of BD, thus not addressing the specificity of our findings for bipolar depression. The younger age, short length of illness and minimal prior treatment (most drug-free/naïve patients) are major strengths of this investigation and also a novelty in OxS research in BD during depression.

Overall, the present findings suggest a compensatory elevation in antioxidant enzymes CAT and GPx during depressive episodes in early stage of BD, with a decrease in lipid peroxidation (TBARS) associated with lithium's antidepressant actions. The present results reinforce the role for altered oxidative stress in the pathophysiology of BD and potential clinically relevant antioxidant effects of lithium in the prevention of illness progression.

Conflict of interest

CAZ is listed as co-inventor on a patent for the use of ketamine in major depression and have assigned their patent rights on ketamine to the US government. The other authors report no conflict of interest.

Contributors

All authors contributed to manuscript writing or data analysis, and agreed to submit the final version for publication.

Role of the funding source

Sao Paulo Research Foundation (Fapesp) funded the study, but had no role in study design or analysis.

Acknowledgments

This study was sponsored by Sao Paulo Research Foundation (Fapesp, Brazil). The Laboratory of Neuroscience is supported by the Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS).

References

- Abdalla DS, Monteiro HP, Oliveira JA, Bechara EJ. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. *Clin Chem* 1986;32:805–7.
- Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res* 2005;125:68–72.
- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* 2007a;41:523–9.
- Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, et al. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 2007b;153:27–32.
- Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, et al. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2009;34:263–71.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* 2008;111:135–44.
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2010;67:360–8.
- Banerjee U, Dasgupta A, Rout JK, Singh OP. Effects of lithium therapy on Na⁺-K⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;37:56–61.
- Berk M, Berk L, Dodd S, Cotton S, Macneil C, Daglas R, et al. Stage managing bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2013 Jun 20. <http://dx.doi.org/10.1111/bdi.12099>. [Epub ahead of print].
- Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:804–17.
- Berman SB, Hastings TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 1999;73:1127–37.
- Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, et al. Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation* 2005;112:3297–305.
- Bilici M, Efe H, Köroğlu MA, Uydu HA, Bekaroğlu M, Değer O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 2001;64:43–51.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 2003;8:721–37.
- Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:311–24.

- D'Addario C, Dell'Osso B, Palazzo MC, Benatti B, Liotti L, Cattaneo E, et al. Selective DNA methylation of BDNF promoter in bipolar disorder: differences among patients with BDI and BDII. *Neuropsychopharmacol* 2012;37:1647–55.
- de Sousa RT, van de Bilt MT, Diniz BS, Ladeira RB, Portela LV, Souza DO, et al. Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. *Neurosci Lett* 2011;494:54–6.
- Emdadul Haque M, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K, Ogawa N. Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1619:39–52.
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4820–5.
- First M, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. In: Structured clinical interview for DSM-IV axis I disorders. Patient ed. New York: Biometrics Research Department, New York Psychiatric Institute; 1995.
- Fontoura PC, Pinto VL, Matsuura C, Resende A e C, de Bem GF, Ferraz MR, et al. Defective nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling in patients with bipolar disorder: a potential role for platelet dysfunction. *Psychosom Med* 2012;74:873–7.
- Fountoulakis KN, Kelsoe JR, Akiskal H. Receptor targets for antidepressant therapy in bipolar disorder: an overview. *J Affect Disord* 2012;138:222–38.
- Ghribi O, Herman MM, Spaulding NK, Savory J. Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation. *J Neurochem* 2002;82:137–45.
- Grintzalis K, Zisimopoulos D, Grune T, Weber D, Georgiou CD. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* 2013;59:27–35.
- Gsell W, Conrad R, Hickethier M, Sofic E, Fröhlich L, Wichart I, et al. Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. *J Neurochem* 1995;64:1216–23.
- HAMILTON M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960;23:56–62.
- Haerle A, Greil W, Russmann S, Grohmann R. Mono- and combination drug therapies in hospitalized patients with bipolar depression. Data from the European drug surveillance program AMSP. *BMC Psychiatry* 2012 Sep 21;12:153.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1956–61.
- Huang CC, Chang YH, Lee SY, Chen SL, Chen SH, Chu CH, et al. The interaction between BDNF and DRD2 in bipolar II disorder but not in bipolar I disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012;159B:501–7.
- Khairova R, Pawar R, Salvatore G, Juruena MF, de Sousa RT, Soeiro-de-Souza MG, et al. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol Med Rep* 2012;5:680–2.
- Kim HK, Andreazza AC. The relationship between oxidative stress and post-translational modification of the dopamine transporter in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 2012;12:849–59.
- Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:300–8.
- Kuhn DM, Arthur RE, Thomas DM, Elferink LA. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 1999;73:1309–17.
- Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 2002;20:171–5.
- Lai CT, Yu PH. Dopamine- and L-beta-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-Dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Effects of oxidative stress and antioxidant factors. *Biochem Pharmacol* 1997;53:363–72.
- Liochev SI, Fridovich I. The relative importance of HO[•] and ONOO⁻ in mediating the toxicity of O[•]-. *Free Radic Biol Med* 1999;26:777–8.
- Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. *Free Radic Biol Med* 2000;29:714–20.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V, da Silva Vargas R, et al. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 2007;421:33–6.
- Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord* 2009;11(Suppl. 2):92–109.
- Machado-Vieira R, Soeiro-De-Souza MG, Richards EM, Teixeira AL, Zarate Jr CA. Multiple levels of impaired neural plasticity and cellular resilience in bipolar disorder: developing treatments using an integrated translational approach. *World J Biol Psychiatry* 2013 Sep 2.
- Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:463–93.
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, et al. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:293–307.
- Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama* 2008;62:141–50.
- Montero D, Walther G, Perez-Martin A, Roche E, Vinet A. Endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in obese children and adolescents: markers and effect of lifestyle intervention. *Obes Rev* 2012;13:441–55.
- Nocito A, Dahm F, Jochum W, Jang JH, Georgiev P, Bader M, et al. Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol* 2007;133:608–18.
- Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2642–7.
- Ogita K, Kitago T, Nakamuta H, Fukuda Y, Koida M, Ogawa Y, et al. Glutathione-induced inhibition of Na⁺-independent and -dependent bindings of L-[3H] glutamate in rat brain. *Life Sci* 1986;39:2411–8.
- Ozaki N, Chuang DM. Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain. *J Neurochem* 1997;69:2336–44.
- Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 2004;19:89–95.
- Palmeira CM, Santos MS, Carvalho AP, Oliveira CR. Membrane lipid peroxidation induces changes in gamma-[3H]aminobutyric acid transport and calcium uptake by synaptosomes. *Brain Res* 1993;609:117–23.
- Plein H, Berk M. The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness. *Hum Psychopharmacol* 2001;16:229–36.
- Polidori MC, Frei B, Cherubini A, Nelles G, Rordorf G, Keaney JF, et al. Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke. *Free Radic Biol Med* 1998;25:561–7.
- Raffa M, Barhoumi S, Atig F, Fendri C, Kerkeni A, Mechri A. Reduced antioxidant defense systems in schizophrenia and bipolar I disorder. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;39:371–5.
- Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res* 2003;121:109–22.
- Reddy R, Sahebarao MP, Mukherjee S, Murthy JN. Enzymes of the antioxidant defense system in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1991;30:409–12.
- Schäfer M, Goodenough S, Moosmann B, Behl C. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain Res* 2004;1005:84–9.
- Shao L, Young LT, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry* 2005;58:879–84.
- Soeiro-de-Souza MG, Andreazza AC, Carvalho AF, Machado-Vieira R, Young LT, Moreno RA. Number of manic episodes is associated with elevated DNA oxidation in bipolar I disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16:1505–12.
- Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry* 2005;10:900–19.
- Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2006;31:189–96.
- Varga V, Jenei Z, Janáky R, Saransaari P, Oja SS. Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem Res* 1997;22:1165–71.
- Volterra A, Trotti D, Racagni G. Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol* 1994;46:986–92.
- Wasserman MJ, Corson TW, Sibony D, Cooke RG, Parikh SV, Pennefather PS, et al. Chronic lithium treatment attenuates intracellular calcium mobilization. *Neuropsychopharmacol* 2004;29:759–69.
- Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar Disord* 2013 Feb;15(1):1–44.
- Yazlovitskaya EM, Edwards E, Thotala D, Fu A, Osusky KL, Whetsell WO, et al. Lithium treatment prevents neurocognitive deficit resulting from cranial irradiation. *Cancer Res* 2006;66:11179–86.
- Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry* 1978;133:429–35.

7.2. Artigos submetidos

7.2.1. Lithium Increases Nitric Oxide Levels in Subjects with Bipolar Disorder during Depressive Episodes

Lithium Increases Nitric Oxide Levels in Subjects with Bipolar Disorder during Depressive Episodes

Rafael T. de Sousa¹, Marcus V. Zanetti^{1,2,3}, Geraldo F. Busatto^{2,3}, Margaret G. Mouro⁵, Carlos A. Zarate Jr.⁴, Wagner F. Gattaz^{1,2}, Elisa M. Higa⁴, Rodrigo Machado-Vieira^{1,2,4*}

¹Laboratory of Neuroscience, LIM-27, Institute and Department of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil

²Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of Sao Paulo, Brazil

³Laboratory of Psychiatric Neuroimaging, LIM-21, Department and Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil

⁴Experimental Therapeutics and Pathophysiology Branch (ETPB), National Institute of Mental Health, NIH, Bethesda, MD, USA

⁵Department of Medicine, Nephrology Division, UNIFESP/Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo, Brazil

Running title: Lithium Increases Nitric Oxide

Abbreviations

BD, Bipolar Disorder; *CGI*, Clinical Global Impression; *CREB*, cyclic-AMP-responsive-element-binding protein; *HAM-D*, 21-item Hamilton Depression Scale; *MDD*, Major Depressive Disorder; *NO*, Nitric Oxide; *eNOS*, endothelial nitric oxide synthase; *iNOS*, inducible nitric oxide synthase; *nNOS*, neuronal nitric oxide synthase; *SCID*, Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders; *YMRS*, Young Mania Rating Scale.

Keywords: Bipolar disorder, nitric oxide, lithium, treatment, depression, plasticity

Corresponding author:

*Rodrigo Machado-Vieira, MD, PhD

Laboratory of Neuroscience (LIM27),

Department and Institute of Psychiatry,

University of Sao Paulo, Brazil.

machadovieira@gmail.com

Abstract

Background: Altered nitric oxide (NO) signaling has been associated with the pathophysiology of Bipolar Disorder (BD), directly affecting neurotransmitter release and synaptic plasticity cascades. Lithium showed to regulate NO in preclinical models. However, no study has addressed peripheral NO levels in unmedicated BD. Also, lithium's effects on NO levels have not been studied in humans.

Methods: Plasma NO was evaluated in subjects with BD I and II during a depressive episode (n=26). Subjects had a score of ≥ 18 in the 21-item Hamilton Depression Rating Scale and were followed-up during a 6-week trial with lithium. Plasma NO levels were also compared to matched healthy controls (n=28). NO was determined by chemiluminescence method.

Results: Lithium treatment significantly increased plasma NO levels after 6 weeks of treatment in comparison to baseline levels in bipolar depression ($p=0.016$). Baseline NO levels during depressive episodes showed no difference when matching up to healthy controls ($p=0.66$).

Conclusion: The present findings suggest that lithium modulates NO signaling in humans. Specifically, in unmedicated BD with short illness duration, lithium increased plasma NO levels after 6 weeks of therapy. Plasma NO levels showed no changes during depressive episodes in BD compared to healthy controls. Further studies with larger samples are needed to confirm the effects of lithium on NO pathway and its association with neuroprotection and synaptic plasticity.

Introduction

Recent studies have suggested that nitric oxide (NO) signaling is a potential therapeutic target in mood disorders (Ghasemi and Dehpour, 2011). Post-mortem studies in MDD showed less neuronal nitric oxide synthase levels in the locus coeruleus and lower number and density of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the hypothalamic nuclei compared to healthy controls (Bernstein et al., 2005; Bernstein et al., 2002; Bernstein et al., 1998; Karolewicz et al., 2004). Regarding peripheral NO levels in MDD, Suzuki et al. (2001) found increased plasma NO levels, whereas other study found no alteration (Kim et al 2006). In medication-free depression, decreased NO levels were found in different studies (Chrapko et al., 2004; García et al., 2011; Herken et al., 2007; Selley, 2004). Regarding investigations in BD, it was found increased NO levels during different mood states (Andreazza et al., 2008), including depressive episodes (Selek et al., 2008). In Selek et al (2008), patients were evaluated in a naturalistic setting using diverse psychotropic drugs.

The NO pathway is especially relevant in neuropsychiatric disorders. NO modulation was shown to affect the release of neurotransmitters (Prast and Philippu, 2001) and synaptic plasticity (Bon and Garthwaite, 2003). NO has dose-dependent effects; at high concentrations it has neurotoxic properties and when at physiological concentrations has a neuromodulator and a neuroprotective role (Calabrese et al., 2007). Its role in neuroprotection is associated with decreased Ca^{2+} influx and consequently inhibition of cell death (Liu and Stamler, 1999). Also, NO increases the neuroprotective proteins Akt (Ciani et al., 2002) and cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (CREB) (Riccio et al., 2006), also inducing the production of bilirubin, a potent antioxidant (Sergent et al., 1997).

NO effects are consistent with the neuroprotective and neurotrophic actions of lithium (de Sousa et al., 2011; Machado-Vieira et al., 2009). Lithium is a standard treatment for BD and used as first option treatment for bipolar depression (Yatham et al 2013). Its mechanism of action is complex, affecting multiple intracellular signaling pathways. Several animal models showed that lithium regulates central and peripheral NO levels (Ghasemi and Dehpour, 2011). Studies in rodents have shown that lithium regulates the expression of the enzyme NO synthase (Anai et al., 2001; Bagetta et al., 1993; Bhalla et al., 2010; Feinstein, 1998) and NO activity (Harvey et al., 1994; Maruta et al., 2005), but results are mixed.

The present study compared plasma NO levels in unmedicated subjects with BD patients during depressive episodes in comparison to healthy controls. To date, NO levels have not been studied in drug-free patients with bipolar depression. In addition, although many studies were performed in animal models or *in vitro*, lithium's effects on NO have not been systematically evaluated in humans. Thus, lithium's effects on NO levels were evaluated in bipolar depression in a 6-week trial.

Methods

Subjects

Between August 2010 and June 2012, 26 outpatients, 7 (26.9%) men and 19 (73.1%) women, with a mean age of 27.7 (± 4.8) years and a diagnosis of BD, experiencing a major depressive episode, diagnosed by Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders (SCID) (First et al., 1995), were enrolled in the study. Patients were recruited through media advertisement and evaluated at the Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil.

Patients were required to have a score ≥ 18 on the 21-item Hamilton Depression Scale (HAM-D) (Hamilton, 1960) when enrolled. Assessment of symptoms was also made with Young Mania Rating Scale (YMRS), and Clinical Global Impression – Severity (CGI-S) (Petkova et al., 2000). Diagnosis and psychometric assessments were performed by experienced psychiatrists. Patients were excluded if they had any medical disorder that could affect the central nervous system, current substance abuse or dependence or mental retardation.

For comparison with patients, 28 age-matched (± 3 years) healthy controls, 16 (57.1%) men and 12 (42.9%) women, with a mean age of 28.0 years (± 7.2) were also studied. Controls were excluded from the present investigation if there was a lifetime history of any mental disorder (as assessed with SCID), including substance disorders, or any disease affecting central nervous system or any first-degree relative with mood or psychotic disorder.

This study had approval by the local institutional review board, and all participants provided written informed consent prior to entering the study.

Study Design

Patients had blood samples collected before treatment (at baseline) and after treatment (at endpoint), and were matched with samples from healthy controls. At baseline, patients received lithium carbonate at 450 mg/day, with flexible increases in doses according to clinical improvement. Most patients were taking lithium monotherapy, although the use of hypnotics as needed was allowed and 2 patients who were also using antipsychotics/mood stabilizers. Psychometric assessments were made on week 0 (baseline) and weeks 1, 2, 4 and 6 (endpoint). Criterion for clinical response was a

decrease of 50% or more in the HAM-D at endpoint and for remission a HAM-D <8 and YMRS<8 at endpoint.

Assays

Blood samples were collected from 8:00 to 10:00AM in vacutainer tubes from patients and controls in 8-hour fasting. Samples were centrifuged at 20°C and 1620 x g for 15 minutes to obtain plasma. Plasma was frozen and stored at -80°C.

Since Griess reaction has been shown not to be accurate for NO measures (Hunter et al., 2013), NO plasma samples were determined by chemiluminescence using Model 280 Nitric Oxide Analyzer (NOA™) from Sievers Instruments, Inc. (Boulder, CO, USA), which is a high-sensitive detector for measuring nitric oxide (Hunter et al., 2013), based on gas-phase chemiluminescent reaction between nitric oxide and ozone: $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{O}_2$ and $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_2 + \text{h}\nu$. The photon emission from electrically excited nitrogen dioxide was detected by a thermoelectrically cooled photomultiplier tube. Measurement of NO and its reaction products in liquid samples has a sensitivity around 1 pmol (Hampl et al., 1996).

Statistics

Chi-square test was used to compare gender in patients and controls. For samples with normal distribution Student's t test was used for comparisons and when samples had non-normal distribution, comparisons were performed with Mann-Whitney and Wilcoxon Signed Ranks tests. Correlations were evaluated with Spearman test. Statistical analysis was performed using SPSS 14.0. Significance level was set at <0.05 (two-tailed).

Results

Demographic and clinical data

Demographic and clinical data of BD patients and controls are summarized in Table 1. From the 26 patients enrolled, 9 (34.6%) had diagnosis of type I BD and 17 (65.4%) of type II BD; 24 (92.3%) patients were medication-free for at least 6 weeks before enrollment in the study and among those, 20 (76.9%) were drug-naïve. Patients had illness duration of mean 36.6 months (± 19.4) and history of previous psychotic mood episode was present in only 3 subjects (11.5%) patients. A significant decrease in depressive symptoms measured by HAM-D was observed from baseline (22.6 ± 2.9) to endpoint (7.0 ± 6.2) ($z = -4.35$, $p < 0.001$), 22 (84.6%) patients responded to treatment and 16 (61.5%) patients achieved remission.

[Table 1 here]

Lithium treatment increased NO plasma levels

Lithium treatment significantly increased NO levels from baseline ($78.8 \pm 20.4 \mu\text{M}$) to endpoint ($99.1 \pm 53.6 \mu\text{M}$) ($z = -2.42$, $p = 0.016$) (Figure 1). NO at endpoint was not different in responders compared to non-responders ($z = -0.79$, $p = 0.43$) and in remitters versus non-remitters ($t = -0.70$, $p = 0.48$). Also, NO change (endpoint NO — baseline NO) was not correlated with HAM-D change ($\rho = -0.10$, $p = 0.63$). NO levels at endpoint did not correlate with endpoint serum lithium ($\rho = -0.24$, $p = 0.25$), age ($p = 0.28$), lithium serum ($p = 0.25$), illness duration ($p = 0.60$), or any other demographic/clinical variable (data not shown).

[Figure 1 here]

Similar plasma NO levels in bipolar depression and controls

Plasma NO levels in bipolar depression at baseline ($78.6 \pm 19.8 \mu\text{M}$) were not significantly different from NO levels in healthy controls ($88.4 \pm 39.9 \mu\text{M}$) ($z = -0.48$,

$p=0.63$) (Figure 1). Although BD and control groups showed difference for gender, no significant differences were observed between males and females with regard to NO levels ($z=-0.45$, $p=0.66$). Baseline HAM-D scores and NO levels did not show significant correlation ($\rho=-0.35$, $p=0.08$). Also, baseline NO was not correlated with age ($\rho=0.03$, $p=0.90$), illness duration ($\rho=0.06$, $p=0.79$) or any other variable (data not shown).

Discussion

To our best knowledge, this is the first study reporting the effects of lithium at NO pathway in humans. It was shown that lithium significantly increased NO levels in BD depression after 6 weeks of treatment. No significant difference in NO levels was observed in unmedicated bipolar depression compared to matched healthy controls. For the first time, NO levels were evaluated in a sample where most of the BD patients were also drug-naïve. Also, no association between lithium-induced NO increase and clinical improvement was observed.

The present findings suggest that NO may be regulated by lithium in humans. Similar to our findings, a growing body of preclinical evidence suggests that lithium has direct effects targeting at NO signaling (reviewed in Ghasemi & Dehpour, 2011). Lithium has been shown to increase NO synthase (NOs) mRNA expression in glial cultured cells (Feinstein, 1998). It also increased NOs expression in the hypothalamus (Anai et al., 2001) and hippocampus (Bagetta et al., 1993) as well as enhanced cortical NO metabolites (Harvey et al., 1994) in rodents. Other preclinical studies, however, found lithium decreasing NO metabolites in rat neural tissue (Bhalla et al., 2010; Maruta et al., 2005).

In the present investigation, plasma NO levels in bipolar depression were not different from healthy controls. In mood disorders, studies on NO showed mixed results. In MDD, NO was decreased evaluating drug-free patients with during depressive episodes (Chrapko et al., 2004; García et al., 2011; Herken et al., 2007; Selley, 2004), while increased (Suzuki et al., 2001) or unaltered (Kim et al., 2006) NO levels were also observed. Meanwhile, in BD, increased NO levels was observed in most of the studies (Andreazza et al., 2008). Only one study, however, evaluated NO during a depressive episode in BD (Selek et al., 2008). This study showed elevated NO levels in subjects with bipolar depression under multiple medications (Ikenouchi-Sugita et al., 2009; Lara et al., 2003; Maia-de-Oliveira et al., 2012). The fact that our sample comprised drug-free patients with short duration of illness is a possible explanation for the discordance with the other study in bipolar depression. It is also possible that NO may have a more important role in bipolar depression later in the course of the illness, after patients have been exposed to chronic insults such as recurrent episodes, medications effects, comorbidities and others. Another difference is that more than half of the patients enrolled in this study were BD II subjects, while other studies evaluating NO included predominantly evaluated BD I.

A strength of our study was that we used a chemiluminescence analyzer for the measurement of NO levels, a method that was shown to be more accurate than the Griess reaction (Hunter et al., 2013) which was used to evaluate NO levels in previous studies in MDD (García et al., 2011; Kim et al., 2006) and in all studies in BD (Andreazza et al., 2008). Moreover, our sample comprised young patients, with short duration of illness, and mostly drug-free, increasing specificity of findings. The relative small sample size of the study may represent a limitation.

Overall, the present findings suggest that lithium modulates NO signaling in subjects with BD during depressive episode, with no direct association with the pathophysiology of the illness. These findings may support a potential role for NO signaling in the neurotrophic and neuroprotective effects of lithium observed in BD and other neuropsychiatric disorders. Further studies with larger samples, however, are needed to confirm these preliminary findings.

References

- Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles, 2001, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition: *Biochem J*, v. 357, p. 593-615.
- Anai, H., Y. Ueta, R. Serino, M. Nomura, Y. Nakashima, and H. Yamashita, 2001, Activation of hypothalamic neuronal nitric oxide synthase in lithium-induced diabetes insipidus rats: *Psychoneuroendocrinology*, v. 26, p. 109-20.
- Andreazza, A. C., M. Kauer-Sant'anna, B. N. Frey, D. J. Bond, F. Kapczinski, L. T. Young, and L. N. Yatham, 2008, Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis: *J Affect Disord*, v. 111, p. 135-44.
- Bagetta, G., M. T. Corasaniti, G. Melino, A. M. Paoletti, A. Finazzi-Agrò, and G. Nisticò, 1993, Lithium and tacrine increase the expression of nitric oxide synthase mRNA in the hippocampus of rat: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 197, p. 1132-9.
- Bernstein, H. G., A. Heinemann, D. Krell, H. Dobrowolny, H. Biela, G. Keilhoff, and B. Bogerts, 2005, Hypothalamic nitric oxide synthase in affective disorder: focus on the suprachiasmatic nucleus: *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, v. 51, p. 279-84.
- Bernstein, H. G., A. Heinemann, D. Krell, C. Mawrin, H. Biela, P. Danos, S. Diekmann, G. Keilhoff, B. Bogerts, and B. Baumann, 2002, Further immunohistochemical evidence for impaired NO signaling in the hypothalamus of depressed patients: *Ann N Y Acad Sci*, v. 973, p. 91-3.
- Bernstein, H. G., A. Stanarius, B. Baumann, H. Henning, D. Krell, P. Danos, P. Falkai, and B. Bogerts, 1998, Nitric oxide synthase-containing neurons in the human hypothalamus: reduced number of immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics: *Neuroscience*, v. 83, p. 867-75.
- Bhalla, P., N. Singla, and D. K. Dhawan, 2010, Potential of lithium to reduce aluminium-induced cytotoxic effects in rat brain: *Biometals*, v. 23, p. 197-206.
- Biela, H., R. Brisch, J. Bernard-Mittelstaedt, H. Dobrowolny, T. Gos, B. Baumann, C. Mawrin, H. G. Bernstein, B. Bogerts, and J. Steiner, 2012, Immunohistochemical evidence for impaired nitric oxide signaling of the locus coeruleus in bipolar disorder: *Brain Res*, v. 1459, p. 91-9.
- Bon, C. L., and J. Garthwaite, 2003, On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation: *J Neurosci*, v. 23, p. 1941-8.
- Bschor, T., and M. Bauer, 2006, Efficacy and mechanisms of action of lithium augmentation in refractory major depression: *Curr Pharm Des*, v. 12, p. 2985-92.
- Calabrese, V., C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield, and A. M. Stella, 2007, Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity: *Nat Rev Neurosci*, v. 8, p. 766-75.

- Chrapko, W. E., P. Jurasz, M. W. Radomski, N. Lara, S. L. Archer, and J. M. Le Mellédo, 2004, Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder: *Biol Psychiatry*, v. 56, p. 129-34.
- Ciani, E., M. Virgili, and A. Contestabile, 2002, Akt pathway mediates a cGMP-dependent survival role of nitric oxide in cerebellar granule neurones: *J Neurochem*, v. 81, p. 218-28.
- Contestabile, A., and E. Ciani, 2004, Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation: *Neurochem Int*, v. 45, p. 903-14.
- de Sousa, R. T., M. T. van de Bilt, B. S. Diniz, R. B. Ladeira, L. V. Portela, D. O. Souza, O. V. Forlenza, W. F. Gattaz, and R. Machado-Vieira, 2011, Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study: *Neurosci Lett*, v. 494, p. 54-6.
- Feinstein, D. L., 1998, Potentiation of astroglial nitric oxide synthase type-2 expression by lithium chloride: *J Neurochem*, v. 71, p. 883-6.
- First, M., S. RL, G. M, and W. JBW, 1995, Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders. Patient Ed. : New York: Biometrics Research Department, New York Psychiatric Institute.
- García, R. G., J. G. Zaruk, C. Barrera, A. Pinzón, E. Trillos, W. D. Arenas, C. Luengas, C. Tomaz, and P. López-Jaramillo, 2011, Plasma nitrate levels and flow-mediated vasodilation in untreated major depression: *Psychosom Med*, v. 73, p. 344-9.
- Ghasemi, M., and A. R. Dehpour, 2011, The NMDA receptor/nitric oxide pathway: a target for the therapeutic and toxic effects of lithium: *Trends Pharmacol Sci*, v. 32, p. 420-34.
- Ghribi, O., M. M. Herman, N. K. Spaulding, and J. Savory, 2002, Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation: *J Neurochem*, v. 82, p. 137-45.
- Giovannoni, G., S. J. Heales, J. M. Land, and E. J. Thompson, 1998, The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis: *Mult Scler*, v. 4, p. 212-6.
- Hamilton, M., 1960, A rating scale for depression: *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 23, p. 56-62.
- Hampl, V., C. Waters, and S. Ascher, 1996, Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone., in S. J. S. E. F. M, ed., *Methods in Nitric Oxide*, John Wiley & Sons Ltd, p. 309-318.
- Harvey, B. H., M. E. Carstens, and J. J. Taljaard, 1994, Evidence that lithium induces a glutamatergic: nitric oxide-mediated response in rat brain: *Neurochem Res*, v. 19, p. 469-74.
- Herken, H., A. Gurel, S. Selek, F. Armutcu, M. E. Ozen, M. Bulut, O. Kap, M. Yumru, H. A. Savas, and O. Akyol, 2007, Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment: *Arch Med Res*, v. 38, p. 247-52.
- Hudetz, A. G., H. Shen, and J. P. Kampine, 1998, Nitric oxide from neuronal NOS plays critical role in cerebral capillary flow response to hypoxia: *Am J Physiol*, v. 274, p. H982-9.
- Hunter, R. A., W. L. Storm, P. N. Coneski, and M. H. Schoenfisch, 2013, Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media: *Anal Chem*, v. 85, p. 1957-63.
- Ikenouchi-Sugita, A., R. Yoshimura, H. Hori, W. Umene-Nakano, N. Ueda, and J. Nakamura, 2009, Effects of antidepressants on plasma metabolites of nitric oxide in major depressive disorder: comparison between milnacipran and paroxetine: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 33, p. 1451-3.
- Karolewicz, B., K. Szebeni, C. A. Stockmeier, L. Konick, J. C. Overholser, G. Jurjus, B. L. Roth, and G. A. Ordway, 2004, Low nNOS protein in the locus coeruleus in major depression: *J Neurochem*, v. 91, p. 1057-66.

- Kim, Y. K., J. W. Paik, S. W. Lee, D. Yoon, C. Han, and B. H. Lee, 2006, Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 30, p. 1091-6.
- Lara, N., S. L. Archer, G. B. Baker, and J. M. Le Mellédo, 2003, Paroxetine-induced increase in metabolic end products of nitric oxide: *J Clin Psychopharmacol*, v. 23, p. 408-12.
- Lipton, S. A., D. J. Singel, and J. S. Stamler, 1994, Nitric oxide in the central nervous system: *Prog Brain Res*, v. 103, p. 359-64.
- Liu, L., and J. S. Stamler, 1999, NO: an inhibitor of cell death: *Cell Death Differ*, v. 6, p. 937-42.
- Machado-Vieira, R., H. K. Manji, and C. A. Zarate, 2009, The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis: *Bipolar Disord*, v. 11 Suppl 2, p. 92-109.
- Maia-de-Oliveira, J. P., C. Trzesniak, I. R. Oliveira, M. J. Kempton, T. M. Rezende, S. Iego, G. B. Baker, S. M. Dursun, J. P. Machado-de-Sousa, and J. E. Hallak, 2012, Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis: *Rev Bras Psiquiatr*, v. 34 Suppl 2, p. S149-55.
- Mannick, J. B., C. Schonhoff, N. Papeta, P. Ghafourifar, M. Szibor, K. Fang, and B. Gaston, 2001, S-Nitrosylation of mitochondrial caspases: *J Cell Biol*, v. 154, p. 1111-6.
- Maruta, S., E. Suzuki, M. Yokoyama, T. Sato, K. Inada, S. Watanabe, and H. Miyaoka, 2005, Effects of intraperitoneally injected lithium, imipramine and diazepam on nitrate levels in rat amygdala: *Psychiatry Clin Neurosci*, v. 59, p. 358-61.
- Ozaki, N., and D. M. Chuang, 1997, Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain: *J Neurochem*, v. 69, p. 2336-44.
- Petkova, E., F. M. Quitkin, P. J. McGrath, J. W. Stewart, and D. F. Klein, 2000, A method to quantify rater bias in antidepressant trials: *Neuropsychopharmacology*, v. 22, p. 559-65.
- Prast, H., and A. Philippu, 2001, Nitric oxide as modulator of neuronal function: *Prog Neurobiol*, v. 64, p. 51-68.
- Riccio, A., R. S. Alvania, B. E. Lonze, N. Ramanan, T. Kim, Y. Huang, T. M. Dawson, S. H. Snyder, and D. D. Ginty, 2006, A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons: *Mol Cell*, v. 21, p. 283-94.
- Selek, S., H. A. Savas, H. S. Gergerlioglu, F. Bulbul, E. Uz, and M. Yumru, 2008, The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode: *J Affect Disord*, v. 107, p. 89-94.
- Selley, M. L., 2004, Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression: *J Affect Disord*, v. 80, p. 249-56.
- Sergent, O., B. Griffon, I. Morel, M. Chevanne, M. P. Dubos, P. Cillard, and J. Cillard, 1997, Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture: *Hepatology*, v. 25, p. 122-7.
- Suzuki, E., G. Yagi, T. Nakaki, S. Kanba, and M. Asai, 2001, Elevated plasma nitrate levels in depressive states: *J Affect Disord*, v. 63, p. 221-4.
- Wasserman, M. J., T. W. Corson, D. Sibony, R. G. Cooke, S. V. Parikh, P. S. Pennefather, P. P. Li, and J. J. Warsh, 2004, Chronic lithium treatment attenuates intracellular calcium mobilization: *Neuropsychopharmacology*, v. 29, p. 759-69.
- Yatham, L.N. et al., 2013. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar disorders*, 15(1), pp.1-44.
- Yazlovitskaya, E. M., E. Edwards, D. Thotala, A. Fu, K. L. Osusky, W. O. Whetsell, B. Boone, E. T. Shinohara, and D. E. Hallahan, 2006, Lithium treatment prevents neurocognitive deficit resulting from cranial irradiation: *Cancer Res*, v. 66, p. 11179-86.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of bipolar depression patients and healthy controls.

	Controls (n=28)	Bipolar (n=26)	p
Gender			
Male/Female, n (%)	16 (57.1)/12 (42.9)	7 (26.9)/19 (73.1)	0.03* ^a
Age, years	28.0 (±7.2)	27.7 (±4.8)	0.86 ^b
Bipolar Disorder Type			
Type I/Type II, n (%)		9 (34.6)/17 (65.4)	
Duration of illness, months		36.6 (±19.4)	
Drug-naïve, n (%)		20 (76.9)	
Medication-free, n (%)		24 (92.3)	
History of Psychosis, n (%)		3 (11.5)	
HAM-D			
Baseline/Endpoint		22.6 (±2.9)/7.0 (±6.2)	
YMRS			
Baseline/Endpoint		5.8 (±5.3)/3.8 (±9.2)	
Response, n (%)		22 (84.6)	
Remission, n (%)		16 (61.5)	
Dropout, n (%)		1 (3.8)	
Endpoint serum lithium, mEq/L		0.52 (±0.21)	

HAM-D - Hamilton Depression Scale, YMRS - Young Mania Rating Scale.

*Significantly different. a - Chi-square, b - Student's t test.

Fig. 1. Comparison of nitric oxide levels in bipolar depression patients before treatment, after treatment, and in healthy controls. Bars display standard error mean. * $p=0.016$.

7.2.2. Lithium Increases Leukocyte Mitochondrial Complex I in Short-Term Bipolar Disorder

Lithium Increases Leukocyte Mitochondrial Complex I in Short-Term Bipolar Disorder

Rafael T. de Sousa¹, Emilio L. Streck², Marcus V. Zanetti^{1,3,4}, Gabriela K. Ferreira², Breno S. Diniz¹, Andre R. Brunoni¹, Geraldo F. Busatto^{3,4}, Wagner F. Gattaz^{1,3}, Rodrigo Machado-Vieira^{1,3,5*}

¹Laboratory of Neuroscience, LIM-27, Institute and Department of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil

²Laboratory of Bioenergetics, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

³Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of Sao Paulo, Brazil

⁴Laboratory of Psychiatric Neuroimaging, LIM-21, Department and Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil

⁵Experimental Therapeutics and Pathophysiology Branch (ETPB), National Institute of Mental Health, NIH, Bethesda, MD, USA

Corresponding author:

*Rodrigo Machado-Vieira, MD, PhD
Department and Institute of Psychiatry
University of Sao Paulo, Brazil.
machadovieira@gmail.com
Tel. (301) 443-3721 (U.S.)

Running title: Lithium Increases Mitochondrial Complex I

Abstract

Background: Different lines of evidence suggest that mitochondrial electron transport chain (ETC) dysfunction may be implicated in bipolar disorder (BD) pathophysiology. ETC activity, however, was never assessed *in vivo* in short-term BD or in unmedicated BD patients. Regarding treatment, lithium has been shown to increase ETC gene expression/activity in preclinical models and in *post-mortem* brains of BD subjects. Nevertheless, no study to date has evaluated lithium effects on ETC activity in humans *in vivo*.

Methods: BD patients presenting a depressive episode (n=25) were treated for 6 weeks with lithium. Leukocytes were collected at baseline and endpoint and ETC complexes I-IV activities were measured and compared to healthy controls (n=24).

Results: ETC complexes I-IV activities were not significantly different in unmedicated BD patients at baseline when compared to healthy controls. Lithium significantly increased complex I activity from baseline to endpoint ($p=0.022$), with no changes in complexes II-IV after 6 weeks. Interestingly, plasma lithium levels were significantly correlated with mitochondrial complex I activity after treatment ($p=0.003$).

Limitations: Most of the patients had BD II disorder, and the sample was relatively small.

Conclusion: Our findings demonstrate that lithium selectively increases ETC complex I activity in subjects with BD, positively associated with plasma lithium levels.

Abbreviations

BD, Bipolar Disorder; *ETC*, Electron Transport Chain; *CGI*, Clinical Global Impression; *HAM-D*, 21-item Hamilton Depression Scale; *SCID*, Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders; *TBARS*, Thiobarbituric Acid Reactive Substances; *YMRS*, Young Mania Rating Scale.

Keywords: Complex I, Mitochondria, Lithium, Bipolar Disorder, Depression, Treatment

1. Introduction

Converging lines of evidence suggest the presence of mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of bipolar disorder (BD) (Clay et al., 2011; Machado-Vieira et al., 2013). Initial *in vivo* studies performed with brain magnetic resonance spectroscopy in BD patients showed energy shortage and enhanced lactate levels, indirect indicators of mitochondrial dysfunction (Stork and Renshaw, 2005). Subsequent studies reported increased oxidative stress in *post-mortem* brains and peripheral blood samples of BD subjects (Andreazza et al., 2008; Andreazza et al., 2010; Machado-Vieira et al., 2007), suggesting energy production dysfunctional at mitochondrial electron transport chain (ETC) complexes. A decrease in mitochondrial ETC complex I activity was observed in *post-mortem* brains of BD patients, associated with elevated oxidative stress parameters (Andreazza et al., 2010). Also, there has been evidence of lower expression of genes encoding mitochondrial ETC (Konradi et al., 2004; Soeiro-de-Souza et al., 2012; Sun et al., 2006) in *post-mortem* brains of subjects with BD, and decreased mRNA expression of several complex I subunits in lymphoblastoid cells (Washizuka et al., 2005). Moreover, a genome-wide association study has shown a significant association between the diagnosis of BD and allelic variations of ETC complex I-encoding genes (Consortium, 2007). Taken together, these findings suggest that abnormal mitochondrial ETC activity, especially in complex I, may play a role in the pathophysiology of BD and may also represent a potentially relevant target for BD treatment.

To date, ETC activity *in vivo* was directly evaluated in BD patients in only one study, with no changes in complex I activity compared to healthy controls (Gubert et al., 2013). However, the sample investigated was small and included chronic BD patients using multiple drugs, which might interfere with ETC activity measurements.

Also, ETC activity has never been assessed *in vivo* in short-term BD or in unmedicated subjects with BD. Moreover, no *in vivo* study to date evaluated the relationship between indices of ETC activity and the severity of specific mood episodes in BD.

Lithium is a gold standard treatment for BD; however, its mechanisms associated with therapeutic efficacy are still not fully elucidated (Diniz et al., 2013). In animal models, lithium decreased oxidative stress in rat cerebral cortical cells (Shao et al., 2005); counteract the complex I -inhibitor rotenone (Toker et al., 2013); and protect against amphetamine-induced ETC impairment (Valvassori et al., 2010). In addition, lithium increases ETC activity and gene expression in the brains of rodents (McQuillin et al., 2007; Toker et al., 2013). Brain *post-mortem* studies have shown that lithium treatment was associated with increased gene expression of complex I subunits in BD patients (Sun et al., 2006), as well as with increased ETC activity in subjects without neuropsychiatric disorders (Maurer et al., 2009). Nonetheless, there is no study which addressed the effects of lithium on ETC activity *in vivo*.

Therefore, this study aims to evaluate ETC complexes I-IV activities in leucocytes of BD patients in acute depressive episode in comparison to healthy controls. In addition, we evaluated the effect of lithium treatment on ETC complexes I-IV activities in a 6-week lithium treatment trial. Our predictions were two-fold: that ETC activity would be decreased in unmedicated bipolar depression patients relative to controls; and that lithium treatment would significantly increase ETC activity in bipolar depression patients, associated with symptom improvement.

2. Methods

2.1. Subjects

This study included 25 BD outpatients during a depressive episode, with 6 (24.0%) men and 19 (76.0%) women, and mean age of 28.6 (± 5.9) years. The diagnosis of BD was confirmed using the Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders (SCID) (First et al., 1995). Patients were recruited through media advertisement and were evaluated and followed-up at the Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil.

Inclusion criteria for BD were scores ≥ 18 on the 21-item Hamilton Depression Scale (HAM-D) (Hamilton, 1960) at the first evaluation. Assessment of manic symptoms was performed with the Young Mania Rating Scale (YMRS) (Young et al., 1978) by experienced psychiatrists. BD patients were excluded if they presented any medical disorder that could affect the central nervous system, current substance abuse or dependence, or mental retardation.

The control group included 24 age-matched (± 3 years) healthy volunteers (14 men and 10 women, with a mean age of 27.6 ± 6.6 years). Controls were excluded from this investigation if there was: a lifetime personal history of any psychiatric disorder (as assessed with the SCID), including substance disorders; presence of any disease affecting central nervous system; or a history of mood or psychotic disorders in any first-degree relatives. This study was approved by the local Ethics Committee and all participants gave written informed consent prior to entering the study.

2.2. Study Design

At baseline, patients were started on lithium carbonate at 450 mg/day, with flexible increases in doses according to clinical improvement. Plasma lithium levels

were monitored to avoid toxicity (<1.2 mEq/L). Most BD subjects were kept on lithium monotherapy, with only 3 patients also using other mood stabilizers. The use of hypnotics as needed was also allowed. Psychometric assessments were carried out at week 0 (baseline), week 1, week 2, week 4, and week 6 (endpoint). The criterion for response was a decrease of 50% or more in the HAM-D at endpoint, while remission criteria were HAM-D scores <8 and YMRS scores <8 at endpoint.

2.3. Blood sampling and laboratorial analysis

Patients had blood samples collected at baseline and after 6 weeks on lithium treatment, while controls had one collection. Blood samples were collected from 8:00 to 10:00 AM after 8-hour fasting. Samples were centrifuged at 20°C and $700 \times g$ for 40 minutes and leukocyte pellets were obtained. Phosphate buffered saline (PBS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the pellets and the samples were gradually frozen at -10°C for 30 minutes, at -20°C for 30 minutes, and finally stored at -80°C . After unfreezing, samples were centrifuged, DMSO was withdrawn, and PBS was used to wash the samples. Protein content was determined by the method described by Lowry et al. (1951).

Regarding complexes I-IV activities, the techniques are briefly described as follows: reduced Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase (complex I) activity was evaluated according to Cassina & Radi (1996) by determining the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at $\lambda = 420$ nm. Regarding complex II, Succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase activity was determined using the method described by Fischer et al. (1985). By following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at $\lambda = 600$ nm, complex II activity was measured. The activity of succinate:cytochrome *c* oxidoreductase (complex III) was evaluated according to Fischer et al. (1985). The

activity of complex II-III was measured by cytochrome *c* reduction using succinate as substrate at $\lambda = 550$ nm. Finally, cytochrome *c* oxidase (complex IV) activity was evaluated according to the method of Rustin et al. (1994) and measured by following the absorbance decrease due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* (prepared by reduction of cytochrome with NaBH_4 and HCl) at $\lambda = 550$ nm with 580 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The activity of mitochondrial respiratory chain complexes I-IV were calculated as $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \times \text{mg protein}^{-1}$.

2.4. Statistics

Prior to statistical analysis, Complex I-IV activities were log-transformed to fit requirements for parametric analyses. Chi-square test was used to compare the distribution of gender of patients versus controls. We used independent t-test to compare demographic and clinical characteristics, and complex I-IV activity between BD patients and controls. In addition, we used paired t-tests to compare complex I-IV activity before and after lithium treatment in BD patients. Correlations between demographic and clinical characteristics and complex I-IV activity were evaluated with Pearson tests. All statistical analysis were performed using SPSS 21.0 and significance level was set at <0.05 (two-tailed).

3. Results

3.1. Demographic and clinical data

Demographic and clinical data are summarized in Table 1. From the 25 BD patients enrolled, 9 (36.0%) had a diagnosis of type I BD and 16 (64.0%) of type II BD; 23 (92.0%) patients were medication-free for at least 6 weeks prior to their enrollment in the study and 18 (72.0%) were drug-naïve. Patients had a mean duration

of illness of 35.2 months (± 18.7), and a history of a previous mood episode with psychotic features was present in 4 (16.0%) patients. Depressive symptoms (HAM-D scores) significantly decreased from baseline (22.3 ± 3.4) to endpoint (7.5 ± 6.2) ($z = -4.26$, $p < 0.001$); twenty (80.0%) patients responded to treatment and 14 (56.0%) patients achieved remission. One BD patient discontinued the treatment due to personal problems unrelated to the trial; one BD patient was excluded due to non-adherence to treatment. For one BD patient, the analysis of complex II-III activity showed technical problems and could not be repeated.

[Table 1 here]

3.2. Similar ETC complexes I-IV activities in bipolar depression and controls

ETC complexes activities in patients before lithium treatment were not different from controls (Fig.1): complex I in patients = 938.1 ± 853.5 nmol/mg of protein/min vs. controls = 1141.5 ± 662.1 ($t = -0.73$, $p = 0.47$), complex II in patients = 4.22 ± 7.92 nmol/mg of protein/min vs. controls = 2.70 ± 2.17 ($t = -0.28$, $p = 0.79$), complex II-III in patients = 3.05 ± 2.83 nmol/mg of protein/min vs. controls = 3.47 ± 3.39 ($t = 0.77$, $p = 0.94$), complex IV in patients = 57.63 ± 82.90 nmol/mg of protein/min vs. controls = 62.49 ± 42.24 ($t = -1.57$, $p = 0.12$).

Since the BD and control groups showed an imbalance for gender, we compared the activity of ETC complexes of males versus females in BD patients and then in controls, but no significant differences were observed (data not shown). Baseline ETC complexes were not significantly correlated with baseline HAM-D scores, length of illness, or age (data not shown).

3.3. Lithium treatment significantly increased ETC complex I activity

Lithium treatment significantly increased ETC complex I activity from baseline (938.1 ± 853.5 nmol/mg of protein/min) to endpoint (1547.6 ± 1831.3) ($t = -2.47$,

$p=0.022$) (Fig.1). However, the 6-week lithium treatment did not change the activities of other ETC complexes: complex II pre-treatment= 4.22 ± 7.92 nmol/mg of protein/min vs post-treatment= 4.16 ± 5.32 ($t=-0.74$, $p=0.47$), complex II-III pre-treatment= 3.05 ± 2.83 nmol/mg of protein/min vs post-treatment= 3.39 ± 3.70 ($t=-0.32$, $p=0.75$), and complex IV pre-treatment= 57.63 ± 82.90 nmol/mg of protein/min vs post-treatment= 86.90 ± 176.04 ($t=-0.11$, $p=0.91$).

[Figure 1 here]

3.4. Serum lithium level at endpoint was correlated with ETC complex I activity after treatment

Endpoint serum lithium levels were significantly correlated with ETC complex I activity after treatment ($r=0.59$, $p=0.003$) (Fig.2). However, endpoint serum lithium levels were not correlated with ETC complex II ($r=0.49$, $p=0.86$), complex II-III ($r=0.39$, $p=0.07$), and complex IV ($r=0.13$, $p=0.56$) activities.

[Figure 2 here]

3.5. Activities of ETC complexes I-IV were not associated with clinical improvement

Overall change in HAM-D scores was not significantly correlated with ETC complexes I-IV changes (Baseline activity — Endpoint activity) (complex I, $p=0.77$; complex II, $p=0.17$; complex II-III, $p=0.83$; complex IV, $p=0.20$). Also, endpoint activities of ETC complexes I-IV were not different comparing responders with non-responders (complex I, $p=0.87$; complex II, $p=0.46$; complex II-III, $p=0.62$; complex IV, $p=0.17$). Similarly, when comparing remitters to non-remitters, ETC complexes I-IV also showed no difference (complex I, $p=0.91$; complex II, $p=0.97$; complex II-III, $p=0.47$; complex IV, $p=0.19$).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study reporting the effects of lithium treatment on mitochondrial ETC complexes activity *in vivo* short-term BD. Lithium increased mitochondrial complex I activity after six weeks of treatment by around 65%; moreover, plasma lithium levels were positively correlated with endpoint mitochondrial complex I activity. Baseline mitochondrial ETC, however, showed no alteration in unmedicated bipolar depression compared to healthy controls.

The lack of difference in ETC complexes activities observed between bipolar depression patients and healthy controls in this study was unexpected, since previous *post-mortem* studies in BD pointed out to a decrease in complex I activity (Andreazza et al., 2010) and ETC complexes subunit proteins expression (Konradi et al., 2004; Sun et al., 2006). In addition, complex I subunit protein expression was decreased in peripheral cells of BD patients (Washizuka et al., 2005). A possible explanation for our negative finding could be our recruitment of early stage and unmedicated subjects with BD. It is possible that complex I activity may be selectively altered in later stages of BD when increased oxidative stress is more prominent, since elevated oxidative stress leads to ETC dysfunction (Adam-Vizi, 2005). On the other hand, our findings are consistent with previous studies showing no significant changes in mitochondrial DNA content (de Sousa et al., 2014) or TBARS levels (de Sousa et al., 2013). Also, in a smaller study with euthymic BD subjects (n=12), oxidative stress levels (as measured by TBARS) and ETC complex I activity showed no changes compared to controls (Gubert et al., 2013). No changes in ETC complexes in early stages of BD is compatible with models suggesting that loss of neurotrophic support, increased oxidative stress, and inflammation would not be significantly severe in the early stages of BD (Berk et al., 2013; de Sousa et al., 2013).

ETC is the major component of mitochondria and consists in a series of protein complexes responsible for mitochondrial energy production. The ETC complex I is one of the main sites where electrons are leaked, and impairment in its activity may be an important source of reactive oxygen species, generating oxidative stress (Adam-Vizi, 2005). The lithium-induced increase in ETC complex I activity found in the present study is thus compatible with lithium's efficacy against oxidative stress. Lithium has been found to decrease oxidative stress in subjects with bipolar mania (Machado-Vieira et al., 2007), bipolar depression (de Sousa et al., 2013) and in healthy volunteers (Khairova et al., 2012).

Consistent with the lithium-induced increase in ETC complex I activity, it was demonstrated that lithium counteracts behavioral effects of the ETC complex I inhibitor rotenone in preclinical models of depression and mania (Toker et al., 2013). Also, the brain complex I subunits *NDUFB9*, *NDUFAB1*, and *NDUFS7* expression increased in rodents treated with lithium (McQuillin et al., 2007; Toker et al., 2013). Furthermore, lithium increased prefrontal cortex complex I activity in models of mania (Valvassori et al., 2010). Maurer et al. (2009) recently found that lithium was associated with elevated complex I activity in post-mortem brain from healthy controls. In summary, studies support the effects of lithium targeting at mitochondrial complex I activity in BD.

The increase in ETC complex I activity observed in our study showed a significant positive correlation with serum lithium levels. This is consistent with the dose-dependent increase in complex I activity found by Maurer et al. (2009) in human *post-mortem* brain tissue treated with lithium, reinforcing the validity of the present findings. Consistently, lithium has shown neurotrophic and neuroprotective properties in different models (de Sousa et al., 2011; Diniz et al., 2013). Also, lithium treatment

reduced cytotoxicity, cytochrome c release and caspase-3 activation induced by complex I inhibitor rotenone induced in SH-SY5Y cells (Lai et al., 2006). One mechanism associated with lithium's neuroprotective effect might be the increase in ETC complex I activity observed in our study.

Our present analyses were performed in leukocytes rather than in brain tissue. However, mitochondrial ETC in peripheral cells have been shown activities similar to those of other tissues (Chretien et al., 1994), and leukocyte ETC activity is widely used as a surrogate marker of brain activity in neurological disorders (Ghiasi et al., 2012). This suggests that the values observed herein in leukocytes are highly likely to reflect ETC activity in the brain. Limitations include the fact that most of the patients had BD II disorder, and the relatively small sample size. The latter aspect may have prevented us from detecting a biomarker association with symptom improvement. However, the young age, short length of illness, uniform presence of depressive symptoms in all BD subjects, and use of lithium monotherapy in most BD patients, all increase the specificity of this investigation, avoiding the added variability introduced by aging, illness chronicity, symptom variability at baseline, and action of other drugs on ETC activity.

5. Conclusion

Overall, our findings showed that lithium selectively increases ETC complex I activity in subjects with BD, also correlated with plasma lithium levels. Moreover, the present study provides evidence that ETC deficiency may not be present in early stages of BD. Future longitudinal studies evaluating representative BD cohorts with repeated biomarker measurements are necessary to confirm these findings and clarify

the course of oxidative stress and ETC activity abnormalities across different stages of BD.

Acknowledgments

This study was sponsored by Sao Paulo Research Foundation (Fapesp, Brazil). The Laboratory of Neuroscience is supported by the Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS).

References

- Adam-Vizi, V., 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid. Redox Signal* 7, 1140-1149.
- Andreazza, A.C., Kauer-Sant'anna, M., Frey, B.N., Bond, D.J., Kapczinski, F., Young, L.T., Yatham, L.N., 2008. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 111, 135-144.
- Andreazza, A.C., Shao, L., Wang, J.F., Young, L.T., 2010. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 67, 360-368.
- Berk, M., Berk, L., Dodd, S., Cotton, S., Macneil, C., Daglas, R., Conus, P., Bechdolf, A., Moylan, S., Malhi, G.S., 2013. Stage managing bipolar disorder. *Bipolar Disord.*
- Cassina, A., Radi, R., 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 309-316.
- Chretien, D., Rustin, P., Bourgeron, T., Rötig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clin. Chim. Acta* 228, 53-70.
- Clay, H.B., Sullivan, S., Konradi, C., 2011. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 311-324.
- Consortium, W.T.C.C., 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-678.
- de Sousa, R.T., Uno, M., Zanetti, M.V., Shinjo, S.M., Busatto, G.F., Gattaz, W.F., Marie, S.K., Machado-Vieira, R., 2014. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 48, 32-35.
- de Sousa, R.T., van de Bilt, M.T., Diniz, B.S., Ladeira, R.B., Portela, L.V., Souza, D.O., Forlenza, O.V., Gattaz, W.F., Machado-Vieira, R., 2011. Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. *Neurosci. Lett.* 494, 54-56.
- de Sousa, R.T., Zarate, C.A., Zanetti, M.V., Costa, A.C., Talib, L.L., Gattaz, W.F., Machado-Vieira, R., 2013. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. *J. Psychiatr. Res.*

- Diniz, B.S., Machado-Vieira, R., Forlenza, O.V., 2013. Lithium and neuroprotection: translational evidence and implications for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 9, 493-500.
- First, M., RL, S., M, G., JBW, W., 1995. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders. Patient Ed., New York: Biometrics Research Department, New York Psychiatric Institute.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., Janssen, A.J., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* 153, 23-36.
- Ghiassi, P., Hosseinkhani, S., Noori, A., Nafissi, S., Khajeh, K., 2012. Mitochondrial complex I deficiency and ATP/ADP ratio in lymphocytes of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol. Res.* 34, 297-303.
- Gubert, C., Stertz, L., Pfaffenseller, B., Panizzutti, B.S., Rezin, G.T., Massuda, R., Streck, E.L., Gama, C.S., Kapczinski, F., Kunz, M., 2013. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J. Psychiatr. Res.* 47, 1396-1402.
- Hamilton, M., 1960. A rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 23, 56-62.
- Khairova, R., Pawar, R., Salvatore, G., Juruena, M.F., de Sousa, R.T., Soeiro-de-Souza, M.G., Salvador, M., Zarate, C.A., Gattaz, W.F., Machado-Vieira, R., 2012. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol. Med. Rep.* 5, 680-682.
- Konradi, C., Eaton, M., MacDonald, M.L., Walsh, J., Benes, F.M., Heckers, S., 2004. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 300-308.
- Lai, J.S., Zhao, C., Warsh, J.J., Li, P.P., 2006. Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses. *Eur. J. Pharmacol.* 539, 18-26.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Machado-Vieira, R., Andreazza, A.C., Viale, C.I., Zanatto, V., Cereser, V., da Silva Vargas, R., Kapczinski, F., Portela, L.V., Souza, D.O., Salvador, M., Gentil, V., 2007. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci. Lett.* 421, 33-36.
- Machado-Vieira, R., Soeiro-De-Souza, M.G., Richards, E.M., Teixeira, A.L., Zarate, C.A., 2013. Multiple levels of impaired neural plasticity and cellular resilience in bipolar disorder: Developing treatments using an integrated translational approach. *World J. Biol. Psychiatry*.
- Maurer, I.C., Schippel, P., Volz, H.P., 2009. Lithium-induced enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylation in human brain tissue. *Bipolar Disord.* 11, 515-522.
- McQuillin, A., Rizig, M., Gurling, H.M., 2007. A microarray gene expression study of the molecular pharmacology of lithium carbonate on mouse brain mRNA to understand the neurobiology of mood stabilization and treatment of bipolar affective disorder. *Pharmacogenet. Genomics* 17, 605-617.

- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, 35-51.
- Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2005. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol. Psychiatry* 58, 879-884.
- Soeiro-de-Souza, M.G., Dias, V.V., Figueira, M.L., Forlenza, O.V., Gattaz, W.F., Zarate, C.A., Machado-Vieira, R., 2012. Translating neurotrophic and cellular plasticity: from pathophysiology to improved therapeutics for bipolar disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 126, 332-341.
- Stork, C., Renshaw, P.F., 2005. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol. Psychiatry* 10, 900-919.
- Sun, X., Wang, J.F., Tseng, M., Young, L.T., 2006. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 31, 189-196.
- Toker, L., Bersudsky, Y., Plaschkes, I., Chalifa-Caspi, V., Berry, G., Buccafusca, R., Moechars, D., Belmaker, R.H., Agam, G., 2013. Inositol-Related Gene Knockouts Mimic Lithium's Effect on Mitochondrial Function. *Neuropsychopharmacology*.
- Valvassori, S.S., Rezin, G.T., Ferreira, C.L., Moretti, M., Gonçalves, C.L., Cardoso, M.R., Streck, E.L., Kapczinski, F., Quevedo, J., 2010. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. *J. Psychiatr. Res.* 44, 903-909.
- Washizuka, S., Kakiuchi, C., Mori, K., Tajima, O., Akiyama, T., Kato, T., 2005. Expression of mitochondria-related genes in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 7, 146-152.
- Young, R.C., Biggs, J.T., Ziegler, V.E., Meyer, D.A., 1978. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br. J. Psychiatry* 133, 429-435.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of bipolar depression patients and healthy controls.

	Bipolar (n=25)	Controls (n=24)	p
Gender			
Male/Female, n (%)	6 (24.0)/19 (76.0)	14 (58.3)/10 (41.7)	0.02* ^a
Age, years	28.6 (±5.9)	27.6 (±6.6)	0.57 ^b
Bipolar Disorder Type			
Type I/Type II, n (%)	9 (36.0)/16 (64.0)		
Duration of illness, months	35.2 (±18.7)		
Drug-naïve, n (%)	18 (72.0)		
Medication-free, n (%)	23 (92.0)		
History of Psychosis, n (%)	4 (16.0)		
HAM-D			
Baseline/Endpoint	22.3 (±3.4)/7.5 (±6.2)		
YMRS			
Baseline/Endpoint	6.6 (±5.9)/4.3 (±9.4)		
Response, n (%)	20 (80.0)		
Remission, n (%)	14 (56.0)		
Dropout, n (%)	1 (4.0)		
Endpoint serum lithium, mEq/L	0.47 (±0.20)		

HAM-D - Hamilton Depression Scale, YMRS - Young Mania Rating Scale, a- Chi-square test, b- Student's t test, *significantly different.

Fig.1. Activities of electron transport chain complexes I-IV in bipolar depression subjects at baseline (black bars) and after 6-week lithium treatment (grey bars) compared with controls (white bars).

Fig. 2. Correlation of endpoint complex I activity and lithium serum levels in bipolar depression patients after treatment.

8. REFERÊNCIAS

- Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1140-1149.
- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Ceresér KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, & Gonçalves CA. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* 2007; 41: 523-529.
- Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, Young LT, & Yatham LN. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2009; 34: 263-271.
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, & Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67: 360-368.
- Atmaca M, Yildirim H, Ozdemir H, Poyraz AK, Tezcan E, & Oğur E. Hippocampal 1H MRS in first-episode bipolar I patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30: 1235-1239.
- Aykut DS, Tiryaki A, Özkorumak E, & Karahan C. Nitric oxide and asymmetrical dimethylarginine levels in acute mania. 2012 (p. 10-16): *Klinik Psikofarmakoloji Bulteni*
- Baron KT, Wang GJ, Padua RA, Campbell C, & Thayer SA. NMDA-evoked consumption and recovery of mitochondrially targeted aequorin suggests increased Ca²⁺ uptake by a subset of mitochondria in hippocampal neurons. *Brain Res* 2003; 993: 124-132.

- Bazan NG, Marcheselli VL, & Cole-Edwards K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 137-147.
- Ben-Shachar D, & Karry R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS One* 2008; 3: e3676.
- Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Reshef A, Sheinkman A, & Klein E. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 1999; 2: 245-253.
- Benazzi F. Bipolar II disorder : epidemiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* 2007; 21: 727-740.
- Benes FM, Vincent SL, & Todtenkopf M. The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 395-406.
- Berk M, Berk L, Dodd S, Cotton S, Macneil C, Daglas R, Conus P, Bechdolf A, Moylan S, & Malhi GS. Stage managing bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2013;
- Berk M, Bodemer W, van Oudenhove T, & Butkow N. Dopamine increases platelet intracellular calcium in bipolar affective disorder and controls. *Int Clin Psychopharmacol* 1994; 9: 291-293.
- Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PV, Amminger P, McGorry P, & Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35: 804-817.
- Bertolino A, Frye M, Callicott JH, Mattay VS, Rakow R, Shelton-Repella J, Post R, & Weinberger DR. Neuronal pathology in the hippocampal area of patients with bipolar disorder: a study with proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Biol Psychiatry* 2003; 53: 906-913.

- Beyer JL, & Krishnan KR. Volumetric brain imaging findings in mood disorders. *Bipolar Disord* 2002; 4: 89-104.
- Blass JP, & Brown AM. Lower activity of Krebs cycle enzymes than of electron transport in human brain: disease implications. 2000;(p. 81): *Neurobiology of Aging* , 81.
- Bon CL, & Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 2003; 23: 1941-1948.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, & Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 721-737, 715.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, & Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 766-775.
- Cassina A, & Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 309-316.
- Cecil KM, DelBello MP, Morey R, & Strakowski SM. Frontal lobe differences in bipolar disorder as determined by proton MR spectroscopy. *Bipolar Disord* 2002; 4: 357-365.
- Chang K, Adleman N, Dienes K, Barnea-Goraly N, Reiss A, & Ketter T. Decreased N-acetylaspartate in children with familial bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2003; 53: 1059-1065.
- Chinopoulos C, & Adam-Vizi V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J* 2006; 273: 433-450.
- Ciani E, Virgili M, & Contestabile A. Akt pathway mediates a cGMP-dependent survival role of nitric oxide in cerebellar granule neurones. *J Neurochem* 2002; 81: 218-228.

- Clark J. N-acetyl aspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction 1998;(p. 271–276): Dev Neurosci
- Clay Montier LL, Deng JJ, & Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics* 2009; 36: 125-131.
- D'Addario C, Dell'Osso B, Palazzo MC, Benatti B, Lietti L, Cattaneo E, Galimberti D, Fenoglio C, Cortini F, Scarpini E, Arosio B, Di Francesco A, Di Benedetto M, Romualdi P, Candeletti S, Mari D, Bergamaschini L, Bresolin N, Maccarrone M, & Altamura AC. Selective DNA methylation of BDNF promoter in bipolar disorder: differences among patients with BDI and BDII. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 1647-1655.
- Dager SR, Friedman SD, Parow A, Demopulos C, Stoll AL, Lyoo IK, Dunner DL, & Renshaw PF. Brain metabolic alterations in medication-free patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61: 450-458.
- Davanzo P, Thomas MA, Yue K, Oshiro T, Belin T, Strober M, & McCracken J. Decreased anterior cingulate myo-inositol/creatine spectroscopy resonance with lithium treatment in children with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24: 359-369.
- Davanzo P, Yue K, Thomas MA, Belin T, Mintz J, Venkatraman TN, Santoro E, Barnett S, & McCracken J. Proton magnetic resonance spectroscopy of bipolar disorder versus intermittent explosive disorder in children and adolescents. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 1442-1452.
- de Sousa RT, Uno M, Zanetti MV, Shinjo SM, Busatto GF, Gattaz WF, Marie SK, & Machado-Vieira R. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2014a; 48: 32-35.
- de Sousa RT, Zarate CA, Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, & Machado-Vieira R. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. *J Psychiatr Res* 2014b; 50: 36-41.
- Deicken RF, Fein G, & Weiner MW. Abnormal frontal lobe phosphorous metabolism in bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 915-918.

- Doyle GA, Dahl JP, Bloch PJ, Weller AE, Lohoff FW, Ferraro TN, & Berrettini WH. Association study of polymorphisms in the autosomal mitochondrial complex I subunit gene, NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, and bipolar disorder. *Psychiatr Genet* 2011; 21: 51-52.
- Dror N, Klein E, Karry R, Sheinkman A, Kirsh Z, Mazor M, Tzukerman M, & Ben-Shachar D. State-dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 995-1001.
- Dubovsky SL, Christiano J, Daniell LC, Franks RD, Murphy J, Adler L, Baker N, & Harris RA. Increased platelet intracellular calcium concentration in patients with bipolar affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46: 632-638.
- Eykelenboom JE, Briggs GJ, Bradshaw NJ, Soares DC, Ogawa F, Christie S, Malavasi EL, Makedonopoulou P, Mackie S, Malloy MP, Wear MA, Blackburn EA, Bramham J, McIntosh AM, Blackwood DH, Muir WJ, Porteous DJ, & Millar JK. A t(1;11) translocation linked to schizophrenia and affective disorders gives rise to aberrant chimeric DISC1 transcripts that encode structurally altered, deleterious mitochondrial proteins. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3374-3386.
- Farber SA, Slack BE, & Blusztajn JK. Acceleration of phosphatidylcholine synthesis and breakdown by inhibitors of mitochondrial function in neuronal cells: a model of the membrane defect of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2000; 14: 2198-2206.
- Feier G, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Bavaresco DV, Morais MO, Scaini G, Andersen ML, Streck EL, & Quevedo J. Lithium and valproate modulate energy metabolism in an animal model of mania induced by methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 2013; 103: 589-596.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, & Williams JBW. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Patient Edition (SCID-I/P) 1995;(p. New York: Biometrics Research, New York State Psychiatry Institute.

- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, & Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1985; 153: 23-36.
- Frey BN, Stanley JA, Nery FG, Monkul ES, Nicoletti MA, Chen HH, Hatch JP, Caetano SC, Ortiz O, Kapczinski F, & Soares JC. Abnormal cellular energy and phospholipid metabolism in the left dorsolateral prefrontal cortex of medication-free individuals with bipolar disorder: an in vivo 1H MRS study. *Bipolar Disord* 2007; 9 Suppl 1: 119-127.
- Friedman SD, Dager SR, Parow A, Hirashima F, Demopulos C, Stoll AL, Lyoo IK, Dunner DL, & Renshaw PF. Lithium and valproic acid treatment effects on brain chemistry in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 340-348.
- Gergerlioglu HS, Savas HA, Bulbul F, Selek S, Uz E, & Yumru M. Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 697-702.
- Getting SJ, Segieth J, Ahmad S, Biggs CS, & Whitton PS. Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Res* 1996; 717: 196-199.
- Gigante AD, Bond DJ, Lafer B, Lam RW, Young LT, & Yatham LN. Brain glutamate levels measured by magnetic resonance spectroscopy in patients with bipolar disorder: a meta-analysis. *Bipolar Disord* 2012; 14: 478-487.
- Giulivi C, Zhang YF, Omanska-Klusek A, Ross-Inta C, Wong S, Hertz-Picciotto I, Tassone F, & Pessah IN. Mitochondrial dysfunction in autism. *JAMA* 2010; 304: 2389-2396.
- Gould TD, & Manji HK. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res* 2002; 53: 687-697.
- Govindaraju V, Young K, & Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 2000; 13: 129-153.

- Grover S, Padhy SK, DAS CP, Vasishta RK, Sharan P, & Chakrabarti S. Mania as a first presentation in mitochondrial myopathy. *Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 60: 774-775.
- Grunze H, Vieta E, Goodwin GM, Bowden C, Licht RW, Möller HJ, Kasper S, & Disorders WTFOTGFB. The World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for the Biological Treatment of Bipolar Disorders: Update 2010 on the treatment of acute bipolar depression. *World J Biol Psychiatry* 2010; 11: 81-109.
- Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, Streck EL, Gama CS, Kapczinski F, & Kunz M. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res* 2013; 47: 1396-1402.
- Guidotti A, Auta J, Chen Y, Davis JM, Dong E, Gavin DP, Grayson DR, Matrisciano F, Pinna G, Satta R, Sharma RP, Tremolizzo L, & Tueting P. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology* 2011; 60: 1007-1016.
- Guy WE. Clinical Global Impressions, *ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology, revised* 1976;(p. Rockville, MD: National Institute of Mental Health
- Hahn CG, & Friedman E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. *Bipolar Disord* 1999; 1: 81-86.
- Halliwell B, & Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine* 2007;(p. United States: Oxford University Press Inc., New York.
- Hamakawa H, Kato T, Shioiri T, Inubushi T, & Kato N. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the bilateral frontal lobes in patients with bipolar disorder. *Psychol Med* 1999; 29: 639-644.
- Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; 23: 56-62.

- Hampl V, Waters C, & Ascher S. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In F. M SJSE editor, *Methods in Nitric Oxide* 1996;(p. 309–318): John Wiley & Sons Ltd.
- Hedlund JL, & Vieweg BW. The Hamilton rating scale for depression: a comprehensive review. 1979;(p. 149-165): Journal of Operational Psychiatry
- Hennah W, Thomson P, McQuillin A, Bass N, Loukola A, Anjorin A, Blackwood D, Curtis D, Deary IJ, Harris SE, Isometsä ET, Lawrence J, Lönnqvist J, Muir W, Palotie A, Partonen T, Paunio T, Pylkkö E, Robinson M, Soronen P, Suominen K, Suvisaari J, Thirumalai S, St Clair D, Gurling H, Peltonen L, & Porteous D. DISC1 association, heterogeneity and interplay in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2009; 14: 865-873.
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, & Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009; 361: 1570-1583.
- Hough C, Lu SJ, Davis CL, Chuang DM, & Post RM. Elevated basal and thapsigargin-stimulated intracellular calcium of platelets and lymphocytes from bipolar affective disorder patients measured by a fluorometric microassay. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 247-255.
- Huang CC, Chang YH, Lee SY, Chen SL, Chen SH, Chu CH, Huang SY, Tzeng NS, Lee IH, Yeh TL, Yang YK, & Lu RB. The interaction between BDNF and DRD2 in bipolar II disorder but not in bipolar I disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; 159B: 501-507.
- Iwamoto K, Bundo M, & Kato T. Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 241-253.
- Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Coryell W, Endicott J, Maser JD, Solomon DA, Leon AC, & Keller MB. A prospective investigation of the natural history of the long-term weekly symptomatic status of bipolar II disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 261-269.

- Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon DA, Leon AC, Rice JA, & Keller MB. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59: 530-537.
- Kamboj SS, Kumar V, Kamboj A, & Sandhir R. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in rat brain induced by carbofuran exposure. *Cell Mol Neurobiol* 2008; 28: 961-969.
- Kato T. Role of mitochondrial DNA in calcium signaling abnormality in bipolar disorder. *Cell Calcium* 2008; 44: 92-102.
- Kato T, Hamakawa H, Shioiri T, Murashita J, Takahashi Y, Takahashi S, & Inubushi T. Choline-containing compounds detected by proton magnetic resonance spectroscopy in the basal ganglia in bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 1996; 21: 248-254.
- Kato T, Ishiwata M, Mori K, Washizuka S, Tajima O, Akiyama T, & Kato N. Mechanisms of altered Ca²⁺ signalling in transformed lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2003; 6: 379-389.
- Kato T, & Kato N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2000a; 2: 180-190.
- Kato T, Kunugi H, Nanko S, & Kato N. Association of bipolar disorder with the 5178 polymorphism in mitochondrial DNA. *Am J Med Genet* 2000b; 96: 182-186.
- Kato T, Kunugi H, Nanko S, & Kato N. Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *J Affect Disord* 2001; 62: 151-164.
- Kato T, Murashita J, Kamiya A, Shioiri T, Kato N, & Inubushi T. Decreased brain intracellular pH measured by ³¹P-MRS in bipolar disorder: a confirmation in drug-free patients and correlation with white matter hyperintensity. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1998; 248: 301-306.

- Kato T, Shioiri T, Murashita J, Hamakawa H, Inubushi T, & Takahashi S. Phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and ventricular enlargement in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 1994; 55: 41-50.
- Kato T, Shioiri T, Murashita J, Hamakawa H, Takahashi Y, Inubushi T, & Takahashi S. Lateralized abnormality of high energy phosphate metabolism in the frontal lobes of patients with bipolar disorder detected by phase-encoded 31P-MRS. *Psychol Med* 1995; 25: 557-566.
- Kato T, Shioiri T, Takahashi S, & Inubushi T. Measurement of brain phosphoinositide metabolism in bipolar patients using in vivo 31P-MRS. *J Affect Disord* 1991; 22: 185-190.
- Kato T, Stine OC, McMahon FJ, & Crowe RR. Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brain of patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 1997; 42: 871-875.
- Kato T, Takahashi S, Shioiri T, & Inubushi T. Brain phosphorous metabolism in depressive disorders detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord* 1992; 26: 223-230.
- Kato T, Takahashi S, Shioiri T, & Inubushi T. Alterations in brain phosphorous metabolism in bipolar disorder detected by in vivo 31P and 7Li magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord* 1993; 27: 53-59.
- Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, & Yatham LN. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 447-458.
- Kempton MJ, Geddes JR, Ettinger U, Williams SC, & Grasby PM. Meta-analysis, database, and meta-regression of 98 structural imaging studies in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65: 1017-1032.
- Khairova R, Pawar R, Salvatore G, Jurueña MF, de Sousa RT, Soeiro-de-Souza MG, Salvador M, Zarate CA, Gattaz WF, & Machado-Vieira R. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol Med Rep* 2012; 5: 680-682.

- Kim DJ, Lyoo IK, Yoon SJ, Choi T, Lee B, Kim JE, Lee JS, & Renshaw PF. Clinical response of quetiapine in rapid cycling manic bipolar patients and lactate level changes in proton magnetic resonance spectroscopy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 1182-1188.
- Kim HK, & Andreazza AC. The relationship between oxidative stress and post-translational modification of the dopamine transporter in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 2012; 12: 849-859.
- Kim MY, Lee JW, Kang HC, Kim E, & Lee DC. Leukocyte mitochondrial DNA (mtDNA) content is associated with depression in old women. *Arch Gerontol Geriatr* 2011; 53: e218-221.
- Kirk R, Furlong RA, Amos W, Cooper G, Rubinsztein JS, Walsh C, Paykel ES, & Rubinsztein DC. Mitochondrial genetic analyses suggest selection against maternal lineages in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 508-518.
- Kitto, & GB. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. 1969;(p. 106-116): *Methods Enzymol*
- Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, & Heckers S. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61: 300-308.
- Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, & Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 2002; 20: 171-175.
- Kusumi I, Koyama T, & Yamashita I. Thrombin-induced platelet calcium mobilization is enhanced in bipolar disorders. *Biol Psychiatry* 1992; 32: 731-734.
- Lee BD, Walss-Bass C, Thompson PM, Dassori A, Montero PA, Medina R, Contreras S, Armas R, Ramirez M, Pereira M, Salazar R, Leach RJ, Quezada P, Raventos H, & Escamilla MA. Malic enzyme 2 and susceptibility to psychosis and mania. *Psychiatry Res* 2007; 150: 1-11.

- Lee JW, Park KD, Im JA, Kim MY, & Lee DC. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood is associated with cognitive function in apparently healthy elderly women. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 592-596.
- Lisy ME, Jarvis KB, DelBello MP, Mills NP, Weber WA, Fleck D, Strakowski SM, & Adler CM. Progressive neurostructural changes in adolescent and adult patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2011; 13: 396-405.
- Liu L, & Stamler JS. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 937-942.
- Lovell MA, Xie C, & Markesbery WR. Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 714-720.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- López-Jaramillo C, Lopera-Vásquez J, Gallo A, Ospina-Duque J, Bell V, Torrent C, Martínez-Arán A, & Vieta E. Effects of recurrence on the cognitive performance of patients with bipolar I disorder: implications for relapse prevention and treatment adherence. *Bipolar Disord* 2010; 12: 557-567.
- MacDonald ML, Naydenov A, Chu M, Matzilevich D, & Konradi C. Decrease in creatine kinase messenger RNA expression in the hippocampus and dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2006; 8: 255-264.
- Machado-Vieira R. Tracking the impact of translational research in psychiatry: state of the art and perspectives. *J Transl Med* 2012; 10: 175.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V, da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, & Gentil V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 2007; 421: 33-36.

- Machado-Vieira R, Manji HK, & Zarate CA. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord* 2009; 11 Suppl 2: 92-109.
- Madhavarao CN, Chinopoulos C, Chandrasekaran K, & Namboodiri MA. Characterization of the N-acetylaspartate biosynthetic enzyme from rat brain. *J Neurochem* 2003; 86: 824-835.
- Magalhães PV, Dodd S, Nierenberg AA, & Berk M. Cumulative morbidity and prognostic staging of illness in the Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder (STEP-BD). *Aust N Z J Psychiatry* 2012; 46: 1058-1067.
- Malik AN, & Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* 2013; 13: 481-492.
- Mancuso M, Ricci G, Choub A, Filosto M, DiMauro S, Davidzon G, Tessa A, Santorelli FM, Murri L, & Siciliano G. Autosomal dominant psychiatric disorders and mitochondrial DNA multiple deletions: report of a family. *J Affect Disord* 2008; 106: 173-177.
- Marco R, Pestaña A, Sebastian J, & Sols A. Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. *Mol Cell Biochem* 1974; 3: 53-70.
- Massaad CA, & Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 2013-2054.
- Maurer IC, Schippel P, & Volz HP. Lithium-induced enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylation in human brain tissue. *Bipolar Disord* 2009; 11: 515-522.
- McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, & DePaulo JR. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1277-1286.
- Merikangas KR, Akiskal HS, Angst J, Greenberg PE, Hirschfeld RM, Petukhova M, & Kessler RC. Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder

- in the National Comorbidity Survey replication. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64: 543-552.
- Miyazaki I, & Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama* 2008; 62: 141-150.
- Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, & Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry* 2013; 74: 15-25.
- Moore GJ, Bebchuk JM, Hasanat K, Chen G, Seraji-Bozorgzad N, Wilds IB, Faulk MW, Koch S, Glitz DA, Jolkovsky L, & Manji HK. Lithium increases N-acetyl-aspartate in the human brain: in vivo evidence in support of bcl-2's neurotrophic effects? *Biol Psychiatry* 2000; 48: 1-8.
- Moore GJ, Bebchuk JM, Parrish JK, Faulk MW, Arfken CL, Strahl-Bevacqua J, & Manji HK. Temporal dissociation between lithium-induced changes in frontal lobe myo-inositol and clinical response in manic-depressive illness. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 1902-1908.
- Munakata K, Iwamoto K, Bundo M, & Kato T. Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 525-532.
- Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kunugi H, Tadokoro K, Ozaki N, Inada T, Sakamoto K, Fukunaga T, Iijima Y, Iwata N, Tatsumi M, Yamada K, Yoshikawa T, & Kato T. Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics* 2004; 84: 1041-1050.
- Nakatani N, Hattori E, Ohnishi T, Dean B, Iwayama Y, Matsumoto I, Kato T, Osumi N, Higuchi T, Niwa S, & Yoshikawa T. Genome-wide expression analysis detects eight genes with robust alterations specific to bipolar I disorder: relevance to neuronal network perturbation. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1949-1962.
- Naydenov AV, MacDonald ML, Ongur D, & Konradi C. Differences in lymphocyte electron transport gene expression levels between subjects with bipolar disorder

- and normal controls in response to glucose deprivation stress. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64: 555-564.
- Ohkuma S, Katsura M, Chen DZ, Narihara H, & Kuriyama K. Nitric oxide-evoked [3H] gamma-aminobutyric acid release is mediated by two distinct release mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 36: 137-144.
- Ongür D, Drevets WC, & Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13290-13295.
- Ongür D, Prescott AP, Jensen JE, Cohen BM, & Renshaw PF. Creatine abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Res* 2009; 172: 44-48.
- Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, & Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 2004; 19: 89-95.
- Pacher P, Beckman JS, & Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
- Palmeira CM, Santos MS, Carvalho AP, & Oliveira CR. Membrane lipid peroxidation induces changes in gamma-[3H]aminobutyric acid transport and calcium uptake by synaptosomes. *Brain Res* 1993; 609: 117-123.
- Pennington K, Beasley CL, Dicker P, Fagan A, English J, Pariante CM, Wait R, Dunn MJ, & Cotter DR. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 1102-1117.
- Perlis RH, Purcell S, Fagerness J, Kirby A, Petryshen TL, Fan J, & Sklar P. Family-based association study of lithium-related and other candidate genes in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65: 53-61.
- Plein H, & Berk M. The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness. *Hum Psychopharmacol* 2001; 16: 229-236.
- Post RM. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31: 858-873.

- Prast H, & Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 51-68.
- Purdon AD, & Rapoport SI. Energy requirements for two aspects of phospholipid metabolism in mammalian brain. *Biochem J* 1998; 335 (Pt 2): 313-318.
- Quiroz JA, Gray NA, Kato T, & Manji HK. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 2551-2565.
- Rajkowska G, Halaris A, & Selemon LD. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2001; 49: 741-752.
- Ram Murthy A, Purushottam M, Kiran Kumar HB, ValliKiran M, Krishna N, Jayramu Sriharsha K, Janardhan Reddy YC, Ghosh S, & Jain S. Gender-specific association of TSNAX/DISC1 locus for schizophrenia and bipolar affective disorder in South Indian population. *J Hum Genet* 2012; 57: 523-530.
- Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, Wagh UV, Debsikdar VB, & Mahadik SP. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res* 2003; 121: 109-122.
- Regenold WT, Phatak P, Marano CM, Sassan A, Conley RR, & Kling MA. Elevated cerebrospinal fluid lactate concentrations in patients with bipolar disorder and schizophrenia: implications for the mitochondrial dysfunction hypothesis. *Biol Psychiatry* 2009; 65: 489-494.
- Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-533.
- Riccio A, Alvania RS, Lonze BE, Ramanan N, Kim T, Huang Y, Dawson TM, Snyder SH, & Ginty DD. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* 2006; 21: 283-294.

- Rizzuto R, & Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 2006; 86: 369-408.
- Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Wallace DC, Bunney WE, & Vawter MP. Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One* 2009; 4: e4913.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, & Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228: 35-51.
- Sassi RB, Stanley JA, Axelson D, Brambilla P, Nicoletti MA, Keshavan MS, Ramos RT, Ryan N, Birmaher B, & Soares JC. Reduced NAA levels in the dorsolateral prefrontal cortex of young bipolar patients. *Am J Psychiatry* 2005; 162: 2109-2115.
- Savas HA, Gergerlioglu HS, Armutcu F, Herken H, Yilmaz HR, Kocoglu E, Selek S, Tutkun H, Zoroglu SS, & Akyol O. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. *World J Biol Psychiatry* 2006; 7: 51-55.
- Savaş HA, Herken H, Yürekli M, Uz E, Tutkun H, Zoroğlu SS, Ozen ME, Cengiz B, & Akyol O. Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder. *Neuropsychobiology* 2002; 45: 57-61.
- Schosser A, Gaysina D, Cohen-Woods S, Chow PC, Martucci L, Craddock N, Farmer A, Korszun A, Gunasinghe C, Gray J, Jones L, Tozzi F, Perry J, Muglia P, Owen MJ, Craig IW, & McGuffin P. Association of DISC1 and TSNAX genes and affective disorders in the depression case-control (DeCC) and bipolar affective case-control (BACCS) studies. *Mol Psychiatry* 2010; 15: 844-849.
- Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, & Yumru M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord* 2008; 107: 89-94.

- Senaratne R, Milne AM, MacQueen GM, & Hall GB. Increased choline-containing compounds in the orbitofrontal cortex and hippocampus in euthymic patients with bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res* 2009; 172: 205-209.
- Shao L, Martin MV, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Bunney WE, & Vawter MP. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Ann Med* 2008; 40: 281-295.
- Shao L, Young LT, & Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry* 2005; 58: 879-884.
- Sheline YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 338-352.
- Shepherd D, & Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J* 1969; 114: 597-610.
- Shi XF, Kondo DG, Sung YH, Hellem TL, Fiedler KK, Jeong EK, Huber RS, & Renshaw PF. Frontal lobe bioenergetic metabolism in depressed adolescents with bipolar disorder: a phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy study. *Bipolar Disord* 2012; 14: 607-617.
- Shibuya-Tayoshi S, Tayoshi S, Sumitani S, Ueno S, Harada M, & Ohmori T. Lithium effects on brain glutamatergic and GABAergic systems of healthy volunteers as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32: 249-256.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91: 31S-38S.
- Silverstone PH, McGrath BM, & Kim H. Bipolar disorder and myo-inositol: a review of the magnetic resonance spectroscopy findings. *Bipolar Disord* 2005; 7: 1-10.
- Silverstone PH, Wu RH, O'Donnell T, Ulrich M, Asghar SJ, & Hanstock CC. Chronic treatment with both lithium and sodium valproate may normalize

- phosphoinositol cycle activity in bipolar patients. *Hum Psychopharmacol* 2002; 17: 321-327.
- Steckert AV, Valvassori SS, Moretti M, Dal-Pizzol F, & Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochem Res* 2010; 35: 1295-1301.
- Stine OC, Xu J, Koskela R, McMahon FJ, Gschwend M, Friddle C, Clark CD, McInnis MG, Simpson SG, Breschel TS, Vishio E, Riskin K, Feilotter H, Chen E, Shen S, Folstein S, Meyers DA, Botstein D, Marr TG, & DePaulo JR. Evidence for linkage of bipolar disorder to chromosome 18 with a parent-of-origin effect. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1384-1394.
- Stork C, & Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 900-919.
- Strakowski SM, DelBello MP, Zimmerman ME, Getz GE, Mills NP, Ret J, Shear P, & Adler CM. Ventricular and periventricular structural volumes in first- versus multiple-episode bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 1841-1847.
- Sun X, Wang JF, Tseng M, & Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2006; 31: 189-196.
- Suzuki K, Kusumi I, Sasaki Y, & Koyama T. Serotonin-induced platelet intracellular calcium mobilization in various psychiatric disorders: is it specific to bipolar disorder? *J Affect Disord* 2001; 64: 291-296.
- Thomson PA, Wray NR, Millar JK, Evans KL, Hellard SL, Condie A, Muir WJ, Blackwood DH, & Porteous DJ. Association between the TRAX/DISC locus and both bipolar disorder and schizophrenia in the Scottish population. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 657-668, 616.
- Tretter L, Sipos I, & Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2004; 29: 569-577.

- Valvassori SS, Bavaresco DV, Budni J, Bobsin TS, Gonçalves CL, de Freitas KV, Streck EL, & Quevedo J. Effects of tamoxifen on tricarboxylic acid cycle enzymes in the brain of rats submitted to an animal model of mania induced by amphetamine. *Psychiatry Res* 2013;
- Vieta E, & Suppes T. Bipolar II disorder: arguments for and against a distinct diagnostic entity. *Bipolar Disord* 2008; 10: 163-178.
- Volterra A, Trotti D, & Racagni G. Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 986-992.
- Washizuka S, Ikeda A, Kato N, & Kato T. Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2003a; 6: 421-424.
- Washizuka S, Iwamoto K, Kakiuchi C, Bundo M, & Kato T. Expression of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 in the lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci Res* 2009; 63: 199-204.
- Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, & Kato T. Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003b; 120B: 72-78.
- Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Tajima O, Akiyama T, & Kato T. Expression of mitochondria-related genes in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2005; 7: 146-152.
- Wasserman MJ, Corson TW, Sibony D, Cooke RG, Parikh SV, Pennefather PS, Li PP, & Warsh JJ. Chronic lithium treatment attenuates intracellular calcium mobilization. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 759-769.
- Winsberg ME, Sachs N, Tate DL, Adalsteinsson E, Spielman D, & Ketter TA. Decreased dorsolateral prefrontal N-acetyl aspartate in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2000; 47: 475-481.

- Xiao Y, Zhang J, Wang Y, Wang P, Li X, Ji J, Yang F, Feng G, He L, & He G. Limited association between Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) gene and bipolar disorder in the Chinese population. *Psychiatr Genet* 2011; 21: 42-46.
- Xu C, Li PP, Kennedy JL, Green M, Hughes B, Cooke RG, Parikh SV, & Warsh JJ. Further support for association of the mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2008; 10: 105-110.
- Yanik M, Vural H, Tutkun H, Zoroğlu SS, Savaş HA, Herken H, Koçyiğit A, Keleş H, & Akyol O. The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004; 254: 43-47.
- Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, O'Donovan C, Macqueen G, McIntyre RS, Sharma V, Ravindran A, Young LT, Milev R, Bond DJ, Frey BN, Goldstein BI, Lafer B, Birmaher B, Ha K, Nolen WA, & Berk M. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar Disord* 2013; 15: 1-44.
- Yildiz A, Sachs GS, Dorer DJ, & Renshaw PF. 31P Nuclear magnetic resonance spectroscopy findings in bipolar illness: a meta-analysis. *Psychiatry Res* 2001; 106: 181-191.
- Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, & Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry* 1978; 133: 429-435.
- Zhang J, Li X, Wang Y, Ji J, Yang F, Feng G, Wan P, Lindpaintner K, He L, & He G. Association study on the mitochondrial gene NDUFV2 and bipolar disorder in the Chinese Han population. *J Neural Transm* 2009; 116: 357-361.