ALEXANDRE DUARTE GIGANTE

**Estudo do hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar
após o primeiro episódio de mania através do uso da
espectroscopia por ressonância magnética de próton (^1H -ERM)**

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. Beny Lafer

São Paulo

2013

DEDICATÓRIA

Para Valéria, Júlia e Vitor

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Beny Lafer por ter possibilitado minha ida a Vancouver e ter confiado em mim para representar o PROMAN – Programa de Transtorno Bipolar como *fellow* no Mood Disorders Center. Expresso-lhe meu reconhecimento pela orientação precisa para a produção não só desta tese, como dos artigos científicos que publicamos. Seu papel estimulador e norteador foi constante e essencial para o meu crescimento como pesquisador.

Ao meu orientador em Vancouver, Dr. Lakshmi Yatham, pela confiança e apoio como pesquisador. Ele também me acolheu e encaminhou em Vancouver com excelentes orientações clínicas de supervisão dos pacientes com transtornos do humor da enfermaria do Mood Disorders Center. Agradeço-lhe o profundo apoio para escrever artigos com correções valiosas e sugestões sempre pertinentes.

Ao Prof. Trevor Young, por me receber em seu laboratório em Vancouver, para me supervisionar, respeitando minhas ideias e aceitando-me como parceiro para futuros projetos.

À Prof. Dra. Ana Cristina Andreazza, por ter me ensinado como é vasto o campo da neurobiologia do transtorno bipolar. Igualmente, agradeço-lhe a força da amizade e o estímulo à pesquisa.

Ao colega do Mood Disorders Center, Dr. David Bond, pelos diversos e-mails a que respondeu para sanar minhas dúvidas iniciais a respeito deste projeto. Reconheço que ainda devo agradecer-lhe a ajuda com a escrita em inglês e a amizade.

Aos colegas do Mood Disorders Center, Annie e Maurício, pela amizade, apoio e grande ajuda no período de adaptação de minha família em Vancouver.

Aos colegas do PROMAN, do Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP, Dra. Karla Mathias de Almeida, Dr. José Antônio Amaral, Dra. Lena Nabuco de Abreu, Dra. Ana Kleiman, Dr. Rodrigo Silva Dias, Dr. Fabiano Gonçalves Nery, Dr. Ricardo Toniolo e Psicólogo Bernardo Gomes por me acolherem no grupo e terem me auxiliado com sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao professor Raymond Lam, pelo suporte e orientação durante meu *fellowship* em Vancouver.

À Taís Albuquerque e a Thiago Mendonça, do staff do PROMAN, que contribuíram com seus conhecimentos técnicos para a realização desta tese.

À Elisa Fukujima e Isabel Ataíde, secretárias do Serviço de Pós-Graduação do Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP, pela competência e pela orientação quanto aos trâmites de execução deste doutorado.

À Loreta Musselwhite, secretária do Mood Disorders Center, pelo apoio durante os primeiros dias em Vancouver e durante toda minha estada lá.

Ao apoio institucional e financeiro do Departamento de Psiquiatria da Universidade de British Colúmbia durante meu *fellowship* de 2009 a 2010.

Ao amparo institucional e financeiro da UNOESTE, sem o qual não seria possível a minha ida ao Canadá. Em especial à Regina de Oliveira Lima.

Aos pacientes e controles que participaram desta pesquisa. Muitos tiveram a paciência de terem um médico de outro país que nunca atendera em sua língua.

À minha família, meus pais e irmãos.

À minha mãe, pelo amor que sempre me dedicou.

A meu pai, que me introduziu aos livros e ao prazer de buscar o conhecimento.

À Valéria, minha esposa, pelo apoio de sempre, pela solidariedade e pelo amor. Por ter aceitado a me acompanhar ao Canadá, por me ter apoiado nos momentos difíceis. Por ter compreendido a necessidade de abdicar de meu tempo com a família para me dedicar a esta tese.

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 abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O transtorno afetivo bipolar (TAB)	2
1.2 Fisiopatologia do transtorno afetivo bipolar	5
1.2.1 Estudos de neuroimagem no TAB.....	6
1.2.2 Estudos estereológicos no TAB.....	8
1.2.3 O estresse oxidativo no TAB.....	9
1.2.4 A disfunção mitocondrial no TAB	12
1.2.5 Alterações em cascatas de segundos mensageiros no TAB	13
1.2.6 Alterações do sistema glutamatérgico	17
1.3 O hipocampo	21
1.4. O estudo do hipocampo no TAB.....	27
1.5 A espectroscopia de próton por ressonância magnética (¹ H-ERM).....	29
1.6 ¹ H-ERM no transtorno afetivo bipolar	34
1.6.1 N-acetilaspártato (NAA).....	34
1.6.2 Compostos de colina (GPC+PC)	41
1.6.3 Mio-Inositol (mI).....	43
1.6.4 Glutamato + glutamina (Glx)	43
1.6.5 Creatina (Cr) + fosfocreatina (PCr).....	45
1.6.6 Investigação do hipocampo em portadores de TAB através da ¹ H- ERM.....	46
1.7 O estudo de indivíduos com TAB após o primeiro episódio de mania.....	51
2 JUSTIFICATIVA	52
3 OBJETIVOS	54
4 HIPÓTESES	56

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	58
5.1 Casuística	60
5.2 Critérios de inclusão para portadores de TAB	61
5.3 Critérios de inclusão para controles saudáveis	61
5.4 Critérios de exclusão para todos participantes	61
5.5 Instrumentos de avaliação psiquiátrica	62
5.6 Aquisição de exame de ¹ H-ERM	64
5.7 Processamento da ¹ H-ERM.....	65
5.8 Medidas volumétricas do hipocampo	65
5.9 Análise estatística.....	66
6 RESULTADOS	68
6.1 Segmentação do voxel	74
6.2 Medidas de qualidade da ¹ H-ERM.....	75
6.3 Medidas de metabólitos entre os grupos	78
6.4 Análise exploratória da associação dos metabólitos com variáveis clínicas	81
7 DISCUSSÃO	88
7.1 Caracterização da casuística.....	89
7.2 Qualidade dos dados de ERM.....	92
7.3 Ausência de diferença nos níveis de metabólitos entre os grupos	93
7.3.1 Efeito da duração da doença e presença de múltiplos episódios	93
7.3.2 Possível ausência de alteração dos metabólitos no hipocampo de pacientes com TAB	99
7.4 Associações dos níveis de metabólitos com as características clínicas da amostra	100
7.4.1 A influência do estado de humor.....	100
7.4.2 A influência dos medicamentos.....	102
7.4.3 A influência do uso de substâncias.....	107
7.4.4 Outras influências observadas	108
7.5 Limitações e vantagens do estudo.....	109
8 CONCLUSÃO.....	110
9 REFERÊNCIAS	112

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AGF:	Avaliação Global do Funcionamento
Akt:	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMPA:	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANCOVA:	Análise de co-variância
ANOVA:	Análise de variância
ATP:	Adenosina trifosfato
Bcl-2:	B-cell-lymphoma-2
BDNF :	Brain derived neurotrophic factor
BPRS:	Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica
CA:	Corno de Amon
CaM:	Calmodulina
CCA:	Cortex do cíngulo anterior
CDLPF:	Cortex dorsolateral pré-frontal
CGI:	Escala de Impressão Clínica Global
CID-10:	Classificação Internacional de Doenças
Cr:	Creatina
CREB:	cAMP response element-binding protein
CRLB:	Cramer-Rao Lower Bound
DAG:	Diacylglicerol
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DP:	Desvio padrão
DSM-IV:	Manual Diagnóstico e Estatístico IV
ERK:	Extracellular signal regulated protein kinase
ERM:	Espectroscopia por ressonância magnética

FAST:	FMRIB's Automated Segmentation Tool
FMRIB:	Centro de Imagem por Ressonância Magnética e Ressonância Magnética Funcional do Cérebro de Oxford.
FSL:	FMRIB Software Library
FSL BET:	FMRIB Software Library Brain Extraction Tool
FWHM:	Full width at half maximum
GABA:	Ácido gama-amino-butírico
GluR1:	Sub-unidade 1 do receptor AMPA
Glx:	Glutamato mais glutamina
GPC:	Glicerofosfolina
GPC+PC:	Compostos de colina
GPx:	Glutathione peroxidase
GSK-3B:	Glicogênio sintase quinase 3 beta
HAMD:	Escala de depressão de Hamilton
¹ H-ERM:	Espectroscopia por ressonância magnética de próton
HSC:	Hiperintensidades subcorticais
IMP:	Inositol monofosfatase
IP3:	Inositol trifosfato
LC Model:	Linear Combination Model
LCR:	Líquido céfalo-raquidiano
LTP:	Long term potentiation
MADRS:	Montgomery–Åsberg Depression Rating Scale
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MBV:	Morfometria baseada no voxel
ME:	Múltiplos episódios de alteração do humor
MEK:	Mitogen activated, ERK-activating kinase
mI:	Mio-inositol

MINI:	Entrevista Internacional de Neuropsiquiatria
MV:	Multi-voxel
NAA:	N-acetil-aspartato
NAAG:	N-acetil-aspartato-glutamato
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NR-1:	Subunidade 1 do receptor NMDA
8-OhdG :	8-hidroxideoxi-2-guanosina
8-OHG:	8-hidroxiguanosina
PC:	Fosfocolina
PCr:	Fosfocreatina
PCr+Cr:	Fosfocreatina mais creatina
PEM:	Primeiro episódio de mania
PEPS:	Potenciais excitatórios pós-sinápticos
PI3K:	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma
PIP2:	Fosfoinositol bifosfato
PKC:	Proteína quinase C
PLC:	Fosfolipase C
PRESS:	Point resolved spectroscopy
PROMAN:	Programa de Transtorno Bipolar do Instituto de Psiquiatria da USP
RF:	Rádio-frequência
RMN:	Ressonância magnética nuclear
RNA:	Ácido ribonucleico
ROI:	Region of interest
ROS:	Reactive oxygen species
RSR:	Razão sinal/ruído
SNC:	Sistema nervosa central

SOD:	Superóxido dismutase
SPSS:	Statistical Package for Social Sciences
STEAM:	Stimulated echo acquisition mode
STOP-EM:	Systematic Treatment Optimization Program for Early Mania
T:	Tesla
TAB:	Transtorno afetivo bipolar
TBARS:	Ácido tiobarbitúrico
TE:	Tempo de eco
TEM:	Tamanho de efeito médio
TR:	Tempo de repetição
Trk:	Tirosina quinase
UBC:	Universidade de British Columbia
USP:	Universidade de São Paulo
VU:	Voxel único
Wnt:	Wingless-type mmtv integration site family
YMRS:	Escala de Mania de Young

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton em portadores de transtorno afetivo bipolar.....	35
Tabela 2 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton realizados no hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar	50
Tabela 3- Características demográficas dos grupos de pacientes e controles	70
Tabela 4 - Características clínicas dos pacientes com transtorno afetivo bipolar	71
Tabela 5 - Comorbidade com abuso e dependência de substâncias na amostra de pacientes bipolares.....	72
Tabela 6 - Medicções utilizadas pelos pacientes com transtorno afetivo bipolar	72
Tabela 7 - Avaliações clínicas utilizando escalas.....	73
Tabela 8 - Segmentação do voxel em pacientes com transtorno afetivo bipolar e controles em ambos os hemisférios.....	74
Tabela 9 - Porcentagem de medidas válidas para cada metabólito em pacientes e controles nos hemisférios direito e esquerdo.....	76
Tabela 10 - Medidas de qualidade dos dados da espectroscopia por ressonância magnética de próton em pacientes bipolares e controles.....	77
Tabela 11 - Níveis dos metabólitos no hipocampo de pacientes com transtorno afetivo bipolar e controles saudáveis.....	78
Tabela 12 - Concentrações absolutas dos metabolitos em pacientes com depressão e eutímicos nos hipocampos esquerdo e direito	82
Tabela 13 - Concentrações absolutas dos metabolitos em pacientes com e sem abuso / dependência de álcool e drogas nos hipocampos E e D.....	84

Tabela 14 - Concentrações absolutas dos metabolitos em pacientes em uso de valproato ou lítio nos hipocampos E e D.....	86
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia da formação hipocampal e estruturas adjacentes.....	22
Figura 2 - Figuras representando a disposição dos neurônios e as conexões internas do hipocampo.....	23
Figura 3 - Espectro produzido por exame de ^1H -ERM	30
Figura 4 - Localização do voxel no hipocampo em cortes sagital, axial e coronal	64
Figura 5 - Delimitação do hipocampo para mensuração do volume	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Níveis dos metabólitos no hipocampo direito de pacientes e controles	79
Gráfico 2 - Níveis dos metabólitos no hipocampo esquerdo de pacientes e controles	80

RESUMO

Gigante AD. *Estudo do hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar após o primeiro episódio de mania através do uso da espectroscopia por ressonância magnética de próton (¹H-ERM)* [tese]. São Paulo:Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 149p.

A investigação da fisiopatologia do transtorno bipolar em pacientes no início da doença é uma estratégia para evitar um potencial efeito de confusão associado à duração da doença, presença de múltiplos episódios de alteração do humor e tratamento medicamentoso. Nosso objetivo foi investigar, *in vivo*, metabólitos neuronais do hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar (TAB) usando a espectroscopia por ressonância magnética de próton (¹H-ERM) logo após o seu primeiro episódio de mania. Para isso, foram estudados cinquenta e oito pacientes com TAB tipo I, classificados de acordo com os critérios do DSM-IV (APA, 2000), após o primeiro episódio de mania e 27 indivíduos saudáveis utilizando a ¹H-ERM com um aparelho Philips Achieva de 3T. Voxels com 30X15X15 mm foram posicionados no hipocampo em ambos os lados do cérebro e o sinal foi adquirido utilizando uma sequência PRESS com TE = 35ms e TR = 2000ms. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa LC Model. Os níveis de N-acetil-aspartato, compostos de colina, mio-inositol, creatina e glutamina + glutamato (Glx) foram comparados entre os grupos e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre eles. Esses achados sugerem que no início do curso do TAB não há alterações no metabolismo neuronal ou vulnerabilidade no hipocampo após o primeiro episódio maníaco.

Descritores: Espectroscopia de Ressonância Magnética, transtornos do humor, transtorno bipolar, início da doença, primeiro episódio de mania

SUMMARY

Gigante AD. *Study of the hippocampus of bipolar disorder patients after the first episode of mania using proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013. 149p.

The investigation of the pathophysiology of bipolar disorder in patients at disease onset is a strategy to avoid a potential confounding effect associated with disease duration, presence of multiples mood episodes and pharmacological treatment. Our purpose was to investigate, *in vivo*, neuronal metabolites in the hippocampus of bipolar disorder (BD) patients using proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) soon after their first manic episode. We studied fifty-eight BD I patients meeting DSM-IV (APA, 2000) criteria following their first episode of mania and 27 healthy subjects using ^1H -MRS with a 3.0 T Philips Achieva scanner. Voxels with 30X15X15 mm were placed in the hippocampus on both sides of the brain and the signal was collected using a PRESS sequence with TE = 35ms and TR = 2000ms. Data analysis was performed using the LC Model software. N- Acetyl-Aspartate, choline compounds, myo-inositol, creatine and glutamine + glutamate (Glx) levels were compared between the groups and no statistically significant differences were found. These results suggest that early in the course of BD there are no alterations in neuronal metabolism or vulnerability in the hippocampus after the first manic episode.

Descriptors: Magnetic Resonance Spectroscopy, mood disorders, bipolar disorder, disease onset, first mania

1 INTRODUÇÃO

1.1 O transtorno afetivo bipolar

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é uma doença psiquiátrica crônica caracterizada pela presença de episódios de alteração patológica do humor ao longo da vida. Esses episódios podem se apresentar como depressão, mania, hipomania ou episódios mistos (quando estão presentes sintomas de mania e depressão no mesmo episódio). São episódios recorrentes, de duração variável, intercalados por períodos de normalidade do humor, chamados de eutímia. Os subtipos de TAB são classificados de acordo com os tipos de episódios apresentados ao longo do curso da doença. Portadores de TAB tipo I têm pelo menos um episódio de mania ou misto durante o curso da doença, mas normalmente os episódios são mais numerosos e alternados por episódios depressivos, enquanto portadores de TAB tipo II apresentam episódios de depressão e hipomania, sem apresentar episódios de mania. Há também pacientes que apresentam sintomas mais leves, de ambos os polos, sem evolução para os episódios mais intensos, e que são diagnosticados como portadores de ciclotímia. Alguns indivíduos apresentam quatro ou mais episódios em um ano e são classificados como cicladores rápidos (Bauer et al., 2008).

Segundo dados da National Comorbidity Survey Replication, um estudo epidemiológico americano, a prevalência do TAB na vida é de aproximadamente 4,4% da população geral nos Estados Unidos, incluindo o TAB tipo I, o tipo II e as formas ditas subclínicas (Merikangas et al., 2007). Em estudos realizados no Brasil, a prevalência do TAB na vida, incluindo todas as formas da doença, tem variado de 2,1% (Merikangas et al., 2011) a 8,3% (Moreno; Andrade, 2005). As diferentes taxas

encontradas nesses estudos refletem o fato de eles terem utilizado critérios diferentes para a inclusão dos casos com TAB e formas subclínicas. Quanto à distribuição entre os sexos, no TAB tipo I, a prevalência é igualmente comum entre homens e mulheres, o que difere da depressão unipolar, cuja prevalência em mulheres é claramente maior que em homens (Bauer; Pfennig, 2005). A idade de início do TAB tipo I é significativamente mais baixa que a da depressão unipolar, com maior incidência ocorrendo entre os 12 e os 20 anos de idade (Bauer; Pfennig, 2005). No entanto, o TAB tipo II segue o padrão da depressão unipolar, sendo mais prevalente em mulheres e se iniciando mais tardiamente (Merikangas et al., 2011). A presença de uma idade de início da doença mais precoce tem sido associada à presença de história familiar de TAB e a maior gravidade da doença (Bauer; Pfennig, 2005).

O curso da doença esteve inicialmente associado a um bom prognóstico, mas essa concepção mudou nos últimos anos e hoje o TAB é considerado uma doença altamente incapacitante que está associada a prejuízos funcionais e cognitivos em uma porcentagem significativa dos pacientes (Tohen et al., 2000; MacQueen et al., 2001; Rosa et al., 2010). Em 2020, o TAB poderá ser a sexta causa, em todo o mundo, de anos perdidos devido à incapacitação no grupo de 15 a 44 anos de idade (Murray; Lopez, 1996). A incapacitação devido à doença está intimamente associada à presença de um maior número de episódios, maior duração da doença e à presença de sintomas subclínicos entre os episódios (Denicoff et al., 1999; Zubieta et al., 2001; Martinez-Áran et al., 2011).

Estudos de seguimento observam que os períodos sintomáticos são muito frequentes ao longo da vida. Por exemplo, em um estudo de 20 anos de duração, para pacientes com TAB I e II, os autores observaram que os sintomas de alteração do humor estavam presentes, respectivamente, em 46,6% e 55,8% do tempo (Judd; Schettler,

2010). Para o TAB tipo I, dos sintomas presentes, 12,3% ocorreram durante um episódio, mas 34,3% ocorreram abaixo do limiar para mania ou depressão, portanto sem caracterizar um episódio de alteração do humor. Para o TAB tipo II, 12,6% ocorreram durante um episódio e 43,2% ocorreram como sintomas subclínicos. Isso demonstra que, embora o TAB seja uma doença caracterizada principalmente pela presença de episódios de alteração do humor, a maior parte dos sintomas ocorre abaixo do limiar para a caracterização de um episódio (Judd; Schettler, 2010). Outro fator importante em relação ao curso da doença é que, em ambos os subtipos, os sintomas depressivos são mais prevalentes que os sintomas de elevação do humor. No curso do TAB tipo I, eles duram três vezes mais que os sintomas de hipomania ou mania e no TAB tipo II, duram 37 vezes mais que os sintomas de hipomania (Judd et al., 2003).

Outro aspecto importante é a associação do TAB com outras doenças. A presença de comorbidades psiquiátricas é muito comum nesses pacientes, principalmente, os transtornos ansiosos e o abuso e a dependência de álcool e drogas (Toniolo et al., 2009; Frye; Perugi, 2010; Brietzke et al., 2011). Um estudo identificou que 65% dos pacientes com TAB têm alguma comorbidade psiquiátrica (McElroy et al., 2001). A presença de mais comorbidades está associada ao pior prognóstico e maior risco de suicídio (Oquendo et al., 2004). Comorbidades clínicas também costumam ocorrer em maior número nesses pacientes, tais como hipertensão sistêmica, cardiopatias, acidentes vasculares, diabetes mellitus, tireoideopatias e enxaqueca (Newcomer, 2006; Brietzke et al., 2012; de Almeida et al., 2012). Aparentemente, isso ocorre devido a presença de vias fisiopatológicas comuns entre o TAB e as doenças clínicas citadas, assim como aumento da inflamação e estresse oxidativo, mas também pode haver influência do estilo de vida prejudicial à saúde adotado pelos pacientes

bipolares ou até ser decorrente dos efeitos colaterais dos medicamentos usados para o tratamento.

Além desses fatores que aumentam a gravidade da doença, o risco de suicídio no TAB é alto e contribui para a alta mortalidade associada à doença (Tondo et al., 2003; Abreu et al., 2009). A tentativa de suicídio tem maior probabilidade de ocorrer nos episódios depressivos e mistos e, em pacientes mais graves, a taxa de suicídio na vida pode chegar aos 15%, muito acima das taxas da população geral (Rihmer; Fawcett, 2010). Deve-se ficar atento ao risco de suicídio no início da doença, já que estudos mostram que essa é a fase de maior risco, principalmente em pacientes abaixo dos 30 anos de idade (Osby et al., 2001; Balazs et al., 2003).

Em resumo, o TAB é uma doença relativamente comum que pode levar a grande sofrimento e incapacitação, além de estar associada a altas taxas de mortalidade, seja pelas comorbidades clínicas e psiquiátricas associadas, seja pelo maior risco de suicídio presente nos portadores desse transtorno. A gravidade do quadro pode ser aliviada pelos tratamentos farmacológicos existentes no momento, porém muitos pacientes respondem apenas parcialmente aos medicamentos e muitos sofrem com os efeitos colaterais dos mesmos (Srivastava; Ketter, 2011). Um maior entendimento da fisiopatologia do TAB pode contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos, mais eficazes e com menos efeitos colaterais, visando a diminuir a carga de morbidade e mortalidade associada à doença.

1.2 Fisiopatologia do TAB

Embora muitos estudos tenham investigado a fisiopatologia do TAB, ela não está totalmente elucidada (Kato, 2008). Estudos farmacológicos, realizados nos últimos

50 anos, têm demonstrado anomalias do sistema de neurotransmissão monoaminérgica, particularmente dos sistemas dopaminérgico e adrenérgico, mas existe um consenso atual de que a fisiopatologia do TAB é muito mais complexa e não está restrita a um desequilíbrio desses neurotransmissores (Martinowich et al., 2009; Schloesser et al., 2012). Essa concepção tem contribuído para o aparecimento de estudos da neurobiologia do TAB que utilizam novos parâmetros e novas hipóteses fisiopatológicas. Abaixo revisaremos, entre os campos de estudo da fisiopatologia do TAB mais atuais, aqueles que se relacionam mais diretamente aos achados dos estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton (^1H -ERM).

1.2.1 Estudos de neuroimagem no TAB

Nos últimos anos, estudos de neuroimagem estrutural e funcional têm fornecido evidências sobre as alterações cerebrais associadas ao TAB. Esses estudos têm identificado que estruturas cerebrais pertencentes ao circuito fronto-límbico-subcortical estão associadas às alterações psiquiátricas presentes nessa doença (Strakowski et al., 2005; Cerullo et al., 2009; Strakowski et al., 2012). Os primeiros estudos de imagem realizados com tomografia computadorizada e ressonância magnética de crânio encontraram aumento dos ventrículos laterais e do terceiro ventrículo, além de uma proeminência dos sulcos corticais em pacientes com TAB quando comparados com controles (Elkis et al., 1995). Em seguida, diversos estudos replicaram o achado de que existem mais hiperintensidades subcorticais (HSC) na substância branca do cérebro de pacientes com TAB quando comparados com controles (Videbech, 1997; Ahn et al., 2004; Kato, 2008; Lloyd et al., 2009). As HSC são detectadas por exame de RMN em imagens T2 e correspondem a lesões do tecido cerebral, provavelmente de causa

isquêmica, embora outras etiologias possam estar associadas, principalmente a presença de gliose. Quanto às áreas cerebrais específicas, estudos de neuroimagem na região frontal têm encontrado reduções volumétricas nessa área do cérebro de pacientes com TAB (Arnone et al., 2009) e uma meta-análise recente identificou outras regiões de volume cerebral reduzido, tais como o cíngulo anterior e a ínsula (Ellison-Wright e Bullmore, 2010). A região do sistema límbico também está associada a alterações volumétricas. Apesar da expectativa inicial de encontrar diminuição do volume do hipocampo, como foi observada em pacientes com depressão maior, a maior parte dos estudos estruturais não demonstrou alterações volumétricas nessa área em pacientes com TAB (Ng et al., 2009). No entanto, é provável que achados positivos tenham sido obscurecidos pela influência do lítio, como sugere uma análise recente de 321 pacientes, que identificou uma redução do volume em pacientes não usuários de lítio e um aumento do volume do hipocampo em pacientes usuários desse medicamento, quando comparados com controles (Hallahan et al., 2011). Os achados referentes à amígdala tem se mostrado contraditórios, pois há estudos mostrando aumento, ausência de diferença ou diminuição do volume dessa região na comparação com controles (Chen et al., 2004). Uma meta-análise recente identificou diminuição do volume da amígdala em crianças e um aumento do volume em adultos com TAB (Hajek et al., 2009). Ao avaliar apenas a substância cinzenta cerebral, estudos que utilizaram a técnica de Morfometria Baseada no Voxel (MBV) encontraram reduções da mesma nas regiões do cíngulo, prefrontal, temporal medial e lateral, e parietal em pacientes com TAB (Lochhead et al., 2004; Adler et al., 2005; Lyoo et al., 2006; Nugent et al., 2006). No entanto, alguns estudos de MBV não encontraram alterações entre pacientes e controles (Kubicki et al., 2002; Nugent et al., 2006). Estudos com o método de ROI (do inglês, *region of interest*) encontraram redução de substância cinzenta no cíngulo subgenual (Hirayasu et al.,

1999; Koo et al., 2008), apesar de um estudo ter encontrado aumento de substância cinzenta nessa mesma área, do lado direito (Fornito et al., 2009). Em resumo, estudos de neuroimagem estrutural em pacientes com TAB, em sua maioria, têm encontrado alterações teciduais subcorticais, reduções volumétricas globais e em áreas cerebrais específicas, embora existam resultados inconsistentes (Strakowski et al., 2012).

1.2.2 Estudos estereológicos no TAB

Os achados postmortem seguem na mesma direção dos resultados dos estudos de neuroimagem e, no nível celular, têm encontrado diminuições do tamanho e da densidade dos neurônios e da glia em áreas do cérebro possivelmente associadas ao TAB (Rajkowska, 2002; Gigante et al., 2011). Os achados desses estudos têm estimulado toda uma linha de pesquisa que sugere a existência de uma maior vulnerabilidade das células cerebrais no TAB (Schloesser et al., 2008). No córtex dorsolateral pré-frontal (CDLPF) observou-se uma redução da densidade dos neurônios piramidais (Rajkowska et al., 2001; Sakai et al., 2008) e das células da glia (Rajkowska et al., 2001), mais especificamente de oligodendrócitos (Uranova et al., 2004; Vostrikov et al., 2007). O tamanho das células também foi investigado e observou-se uma redução dos neurônios (Cotter et al., 2002a; Law; Harrison, 2003; Vostrikov et al., 2007). O Córtex do Cíngulo Anterior (CCA) também tem sido bastante investigado, visto que está envolvido na regulação de respostas emocionais (Fountoulakis et al., 2008). Alguns resultados positivos têm sido encontrados nessa área, tais como a redução da densidade (Benes et al., 2001; Bouras et al., 2001; Cotter et al., 2002b; Woo et al., 2004) e do tamanho dos neurônios (Chana et al., 2003). Também foi observada uma redução da densidade de células da glia em pacientes com histórico familiar de TAB (Ongur et al.,

1998), contudo estudos posteriores não encontraram o mesmo resultado (Benes et al., 2001; Cotter et al., 2001; Chana et al., 2003). Nas áreas subcorticais, alterações da densidade ou tamanho das células foram observadas na amígdala (Berretta et al., 2007; Bezchlibnyk et al., 2007), no hipocampo (Benes et al., 1998; Liu et al., 2007) e no tálamo (Byne et al., 2008). Esses achados sugerem a existência de uma maior vulnerabilidade das células do sistema nervoso central (SNC) em pacientes com TAB e podem estar associados aos achados de diminuição de volume encontrados em estudos de neuroimagem. No entanto, é possível que alguns fatores tenham influenciado os resultados, tais como o pH, o intervalo postmortem, o efeito de medicamentos e limitações associadas às técnicas de contagem de neurônios e estes precisam ser mais bem esclarecidos em estudos futuros (Gigante et al., 2011).

1.2.3 O estresse oxidativo no TAB

Para explicar as alterações das células cerebrais no TAB, diferentes hipóteses têm sido consideradas, entre elas a presença de maior estresse oxidativo no SNC de pacientes com TAB (Machado-Vieira et al., 2007a; Andreazza et al., 2008; Wang et al., 2009). Espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) são substâncias tóxicas produzidas em todas as células do corpo humano que possuem potencial para causar lesão molecular, prejudicando o funcionamento da célula. Faz-se necessário, portanto, que as células possuam sistemas de desintoxicação e, sob a fisiologia normal, essa é realizada pela ação de substâncias antioxidantes. No entanto, podem ocorrer situações em que a produção de ROS excede a competência do sistema antioxidante e, nesses casos, a degradação oxidativa de moléculas pode ocorrer, caracterizando-se um estado de estresse oxidativo. É possível investigar a presença do

estresse oxidativo nas células através da detecção dos produtos finais das reações oxidativas e do estudo da atividade das enzimas antioxidantes.

Muitos estudos têm demonstrado a presença de alterações nas medidas das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase no TAB. A maioria dos estudos encontrou atividade aumentada da SOD em portadores de TAB (Abdalla et al., 1986; Kuloglu et al., 2002; Andreazza et al., 2007a; Machado-Vieira et al., 2007; Kunz et al., 2008). Esse aumento da atividade da SOD tem sido atribuído à existência de um mecanismo de compensação para se contrapor à presença do estresse oxidativo celular. Há apenas dois estudos com resultados contraditórios, que encontraram diminuição dos níveis de SOD no TAB (Gergerlioglu et al., 2007; Selek et al., 2008). Alterações também foram relatadas nas medidas de GPx no TAB. Andreazza et al. (2007a) encontraram aumento da atividade dessa enzima em pacientes bipolares eutímicos, embora este achado não tenha sido observado por outros autores (Abdalla et al., 1986; Kuloglu et al., 2002; Ranjekar et al., 2003; Andreazza et al., 2009). A atividade da catalase está diminuída em pacientes bipolares eutímicos (Andreazza et al., 2007a) e aumentada em pacientes não medicados em mania (Machado-Vieira et al., 2007). Kuloglu et al. (2002) também encontraram diminuição dos níveis de catalase em pacientes bipolares. As diferenças de resultados entre os estudos podem ter sido causadas por um efeito confundidor associado ao uso de medicamentos. Por exemplo, observou-se que as atividades da GPx e SOD medidas em neutrófilos de pacientes com TAB diminuem com o uso de lítio (Aliyazicioglu et al., 2007). Outra evidência de aumento do estresse oxidativo no TAB vem de estudos que mostraram aumento dos níveis de outro radical livre, o óxido nítrico, nessa doença (Gergerlioglu et al., 2007; Selek et al., 2008). Além disso, um estudo postmortem encontrou uma expressão gênica diminuída de componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial no córtex frontal de

portadores de TAB (Sun et al., 2006). Esse achado sugere a existência de mau funcionamento dessa cadeia intracelular no TAB e maior produção de ROS. Dano oxidativo a biomoléculas também tem sido descrito no TAB. Machado-Vieira et al. (2007a) estudaram pacientes em mania não medicados e encontraram níveis séricos aumentados de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador de dano oxidativo lipídico e Andreazza et al. (2007a) identificaram que esta alteração está presente na depressão, mania e eutímia. Além disso, uma meta-análise mostrou que TBARS está aumentada no TAB com um tamanho de efeito significativo (Andreazza et al., 2008). Mais recentemente, um estudo postmortem identificou que os níveis de 4-hidroxinonenal, outro marcador de dano oxidativo lipídico, estavam significativamente aumentados (em 59%) no ACC dos cérebros de pacientes com TAB em relação aos controles (Wang et al., 2009). A peroxidação lipídica pode afetar a fosforilação oxidativa, a manutenção do potencial de membrana mitocondrial e a capacidade da mitocôndria de ser um tampão para o Ca^{2+} celular, o que pode levar à necrose ou apoptose da célula (Ott et al., 2007).

Danos a proteínas também foram identificados no cérebro de indivíduos com TAB. Um estudo postmortem demonstrou o aumento da oxidação e nitração de proteínas mitocondriais no córtex pré-frontal de indivíduos com TAB (Andreazza et al., 2010). Além disso, a nitração de proteínas foi encontrada aumentada no plasma de pacientes com TAB, quando comparados com indivíduos controles (Andreazza et al., 2009). Nesse estudo, houve um aumento significativo dos níveis de 3-nitrotirosina nos pacientes em estágio tardio quando comparados com indivíduos na fase inicial da doença. É interessante que um estudo, utilizando células corticais de rato, tenha demonstrado que o valproato de sódio pode evitar a oxidação de proteínas (Wang et al., 2003).

Dano ao DNA é potencialmente mutagênico e pode contribuir para o câncer, envelhecimento prematuro e doenças neurodegenerativas (Ott et al., 2007). ROS podem oxidar o nucleotídeo guanina e gerar as bases modificadas 8-hidroxiguanosina (8-OHG) no RNA e 8-hidroxideoxi-2-guanosina (8-OHdG) no DNA, que podem ser detectadas para identificar e quantificar danos ao RNA e DNA, respectivamente. Em portadores de TAB, um aumento do dano oxidativo ao RNA foi encontrado por um estudo postmortem nas regiões CA1, CA3 e giro dentado do hipocampo (Che et al., 2010). Em resumo, alterações no sistema antioxidante, aumento das substâncias oxidantes e a presença de danos em lipídios, proteínas e RNA foram encontrados no TAB. Assim, o stress oxidativo parece desempenhar um papel importante na fisiopatologia da doença.

1.2.4 A disfunção mitocondrial no TAB

Ainda no nível celular, numerosos estudos têm fornecido evidências da existência de disfunção mitocondrial no TAB, o que também estaria associado à maior vulnerabilidade das células do SNC nessa doença (Kato; Kato, 2000; Kato, 2008). Os estudos iniciais de ERM de fósforo identificaram diminuição do pH intracelular em pacientes portadores de TAB eutímicos (Kato et al., 1993) e níveis mais baixos de fosfocreatina em pacientes com depressão bipolar (Kato et al., 1994; Kato et al., 1995), resultados que sugerem a presença de alterações no metabolismo energético da célula e sugerem disfunção mitocondrial. Outros estudos encontraram perdas e polimorfismos do DNA mitocondrial (Kato; Takahashi, 1996; Kato et al., 1997) em pacientes com TAB. Além disso, estudos utilizando a técnica de microarranjo (tradução aceita do termo em inglês “microarray”) de DNA observaram uma diminuição de vários genes associados à função mitocondrial (Konradi et al., 2004; Iwamoto et al., 2005; Sun et al.,

2006; Vawter et al., 2006). Na mesma linha desses achados, alterações morfológicas das mitocôndrias, tais como anormalidades no tamanho e na distribuição pela célula, têm sido descritas em pacientes com TAB, no cérebro e em outros tecidos do organismo (Cataldo et al., 2010). Segundo Stork e Renshaw (2005), a presença de níveis mais baixos de N-acetil-aspartato (NAA), encontrada em vários estudos de ¹H-ERM no TAB, como veremos adiante, também sugere a presença de prejuízo da função mitocondrial. Além disso, estudos com lítio e valproato têm demonstrado que esses medicamentos atuam em enzimas claramente associadas à função mitocondrial, tais como a glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3B) e a bcl-2 (abreviação do inglês b-cell-lymphoma-2) (Chen et al., 1999; Chuang et al., 2002), o que poderia estar associado à sua função terapêutica. Ainda mais, estudos com a uridina, uma substância que tem um efeito neuroprotetor da função mitocondrial, têm apresentado resultados preliminares indicadores de que ela pode ser benéfica para tratar pacientes com depressão bipolar (Jensen et al., 2008; Kondo et al., 2011). Em resumo, existem evidências suficientes para considerarmos que a função mitocondrial, principalmente no que se refere à produção de energia celular, está comprometida no TAB.

1.2.5 Alterações em cascatas de segundos mensageiros no TAB

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado alterações em cascatas de segundos mensageiros no TAB. Em muitos casos, as cascatas bioquímicas intracelulares envolvidas na fisiopatologia da doença são identificadas após a evidência de que sofrem a ação farmacológica de estabilizadores do humor (Schloesser et al., 2008; Schloesser et al., 2012). A cascata do fosfatidilinositol foi inicialmente implicada na fisiopatologia do TAB após a descoberta do efeito inibidor do lítio sobre a enzima inositol monofosfatase

(IMP), o que induz uma diminuição dos níveis de inositol no cérebro (Berridge et al., 1989). No funcionamento normal dessa via, neurotransmissores ativam receptores ligados à proteína G, que por sua vez ativam a enzima fosfolipase C (PLC), o que promove a hidrólise do fosfoinositol bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). O IP3 é liberado ao citoplasma e promove a liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático (Finch; Augustine, 1998), que ativa proteínas da família da calmodulina (CaM) quinase, promovendo a ativação de fatores transcriptores tais como o CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*), que estimula a expressão gênica e leva à produção de mais proteínas, mais componentes sinápticos, brotamento neuronal e formação de novos circuitos neuronais. O DAG, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC), uma enzima que tem muitos efeitos, incluindo a ativação da fosfolipase A2, que é ativadora da cascata do ácido araquidônico. A hipótese da depleção do inositol postula que o lítio exerce efeito sobre essa cascata, inibindo a IMP, que é importante na transformação do IP3 em inositol livre e reciclagem do PIP2. Isso leva à diminuição do inositol livre e maiores níveis de IP3, o que causa um aumento da ativação da via, levando à estimulação neurotrófica. Estudos têm observado que o lítio de fato diminui os níveis de inositol (Moore et al., 1999; Davanzo et al., 2001), porém a inibição da IMP é considerada modesta e não está claro se é suficiente para levar a alterações importantes dessa via. Há também um descompasso entre a mudança bioquímica imediata e o efeito clínico mais demorado do lítio, o que também diminui o valor dessa hipótese, que tem sido questionada, apesar de ainda ser uma referência importante na discussão da fisiopatologia do TAB (Levi et al., 2013).

Outra cascata intracelular que tem sido associada ao TAB é a via da GSK-3B. Essa é uma quinase que faz parte de diversas vias de sinalização intracelulares, tais

como Wnt (abreviação do inglês *wingless-type mmtv integration site family*), insulina e neurotrofinas e é regulada pela serotonina, dopamina, psicoestimulantes e antidepressivos (Gould; Manji, 2005). Ela tem um papel importante na regulação da sinaptogênese e na sobrevivência, proliferação e diferenciação dos neurônios (Gould et al., 2006). Sabe-se que a GSK-3B é inibida por concentrações terapêuticas de lítio (Klein; Melton, 1996) e essa inibição leva à produção de fatores transcritores que ativam e regulam a morfologia neuronal e a neurotransmissão. Esse efeito do lítio sobre a GSK-3B tem sido associado às propriedades neuroprotetoras desse medicamento. Com a inibição da GSK-3B pelo lítio, ocorre a diminuição da fosforilação e degradação da beta-catenina, levando a um aumento dessa proteína, que foi associada a um efeito estabilizador do humor em um modelo animal de TAB (Gould et al., 2007). Além disso, a GSK-3B tem um papel importante na regulação do ritmo circadiano em estudos pré-clínicos (Kaladchibachi et al., 2007), o que, se mais bem esclarecido, pode contribuir para um maior entendimento das consequências da inibição da GSK-3B pelo lítio. Apesar dos achados promissores, uma evidência direta do papel da GSK-3B na etiologia do TAB ainda não foi encontrada e estudos genéticos não têm encontrado a associação entre polimorfismos da GSK-3B e o TAB.

Outras cascatas neurotróficas também têm sido implicadas na fisiopatologia do TAB. Estudos demonstram que os estabilizadores do humor, lítio e valproato, ativam a cascata da ERK/MAPK (do inglês, *extracellular signal regulated protein kinase/mitogen-activated protein kinase*). Essa cascata é mediadora dos efeitos biológicos desencadeados pelos fatores neurotróficos, sendo ativada pelo BDNF (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*). Em estudos com ratos, a ativação dessa via inibe comportamentos maniformes, tais como resposta aumentada a psicoestimulantes e a atividade de correr no interior da gaiola (Engel et al., 2009). A ativação dessa via leva à

ativação de diversas proteínas envolvidas na plasticidade celular, inclusive a maior produção de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica que tem grande importância na sobrevivência celular. A Bcl-2 está localizada principalmente na membrana externa da mitocôndria e do retículo endoplasmático. Ela ativa vias neurotróficas que induzem à regeneração axonal e ao crescimento de dendritos. Ao mesmo tempo, ela é capaz de inibir a liberação do citocromo c da mitocôndria, o que está diretamente relacionado à sua função antiapoptótica (Bruckheimer et al., 1998). Também é um fato conhecido, através de estudos *in vivo* e *in vitro*, que o valproato e o lítio aumentam de forma robusta a expressão da Bcl-2 (Chen et al., 1999).

O BDNF, uma neurotrofina essencial para o bom funcionamento neuronal, e outras neurotrofinas, ligam-se a um receptor de membrana da família da tirosina quinase (Trk) e isso ativa diversas cascatas intracelulares envolvidas na sobrevivência e crescimento celular, tais como a PI3K/Akt (do inglês, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma / v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*), MEK/ERK (do inglês, *Mitogen Activated, ERK-Activating Kinase/ERK*) e PLC/PIP2. Alterações nos níveis e na expressão do BDNF têm sido demonstradas no TAB por muitos estudos (Kapczinski et al., 2008). BDNF está diminuído em pacientes crônicos com TAB, quando comparados com pacientes no início da doença (Kauer-Sant'Anna et al., 2009). Níveis periféricos de BDNF têm sido encontrados diminuídos em pacientes com TAB em episódios maníacos e depressivos (Cunha et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2007b) e a terapia com lítio aumenta os níveis de BDNF em pacientes maníacos (De Souza et al., 2011). Há evidência, portanto, que o BDNF está envolvido com a fisiopatologia do TAB. Alguns autores têm sugerido que ele pode ser inclusive um biomarcador associado à evolução da doença (Fernandes et al., 2011).

Prejuízos na regulação das cascatas de sinalização do Ca^{2+} também têm sido descritos no TAB. O Ca^{2+} é um mensageiro intracelular que regula diversas funções biológicas no SNC e influencia a liberação de neurotransmissores, a plasticidade neuronal e o metabolismo energético. A capacidade da mitocôndria de funcionar como um tampão para o cálcio intracelular é essencial para o bom funcionamento da célula. Achados no TAB têm sido descritos, tais como a presença de níveis elevados de Ca^{2+} em plaquetas e linfócitos periféricos (Hough et al., 1999) e o efeito do lítio diminuindo os níveis de cálcio intracelular em culturas de neurônios, o que estaria associado à prevenção de estresse oxidativo e apoptose (Tseng e Lin-Shiau, 2002). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que bloqueadores de canais de cálcio têm efeito antimaníaco em pacientes com TAB (Casamassima et al., 2010). Portanto, alterações da sinalização do cálcio estão provavelmente associadas à fisiopatologia do TAB.

1.2.6 Alterações do sistema glutamatérgico

O glutamato é o mais importante neurotransmissor excitatório do cérebro (Hassel; Dingledine, 2006). O papel desse aminoácido é gerar potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS). Entretanto, seu desempenho no funcionamento cerebral é muito mais diverso e complexo (Rahn et al., 2012). No desenvolvimento cerebral, o glutamato age na migração, na diferenciação e na capacidade de sobrevivência do neurônio (Lujan et al., 2005). Em cérebros maduros, está também essencialmente envolvido com neuroplasticidade e com neurotoxicidade (Arundine; Tymianski, 2003; Shao et al., 2005; Dong et al., 2009). O envolvimento do glutamato na transmissão sináptica excitatória e em processos de neurotoxicidade e de neuroplasticidade tem levado a um

crecente interesse sobre seu papel na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos, em particular no TAB.

A investigação do sistema glutamatérgico no TAB tem sido realizada através de diferentes abordagens. Estudos que mediram o glutamato no plasma de pacientes com TAB têm encontrado resultados conflitantes e foram feitos em amostras pequenas de pacientes e controles. Altamura et al. (1993) e Hoekstra et al. (2006) encontraram níveis aumentados de glutamato em pacientes em depressão e mania, respectivamente. Porém, Palomino et al. (2007) encontraram níveis diminuídos de glutamato em pacientes psicóticos durante o primeiro episódio do TAB (os autores não declaram o tipo de humor apresentado pelos pacientes). Apesar desses resultados formarem a primeira linha de evidência de que o sistema glutamatérgico se encontra alterado no TAB, os níveis de glutamato no plasma podem não representar adequadamente os níveis cerebrais, tendo em vista que o glutamato presente no cérebro é produzido localmente, uma vez que ele fora do SNC não ultrapassa a barreira hemato-encefálica (Hassel; Dingledine, 2006).

Um maior número de estudos investigou o glutamato no TAB em tecido cerebral postmortem (Law; Deakin, 2001; Clinton; Meador-Woodroof, 2004; Kristiansen et al., 2005; Beneyto; Meador-Woodruff, 2006; Hashimoto et al., 2007; McCullumsmith et al., 2007). Hashimoto et al. (2007) mediram os níveis de glutamato no cérebro e encontraram níveis aumentados no córtex frontal de pacientes com TAB. Outros estudos investigaram a expressão protéica ou do RNA de subunidades de receptores ou outras moléculas pertencentes ao sistema glutamatérgico e encontraram anormalidades em áreas do cérebro associadas ao TAB, incluindo o córtex pré-frontal dorso-lateral (CPFDL) (Beneyto; Meador-Woodruff, 2006), o hipocampo (Law; Deakin, 2001; McCullumsmith et al., 2007), o estriado (Kristiansen et al., 2005) e o tálamo (Clinton;

Meador-Woodroof, 2004). Os resultados são consistentes evidenciando uma diminuição da expressão de diversas moléculas ligadas à transmissão glutamatérgica em cérebros de pacientes com TAB. Esses achados têm dado suporte para a hipótese de um estado hiperglutamatérgico no cérebro de pacientes com TAB, levando a uma subsensibilização dos receptores, como um mecanismo de compensação para modular a atividade excessiva glutamatérgica (Rao et al., 2007). De fato, a administração crônica do N-metil-D-aspartato (NMDA), um análogo do glutamato do qual o receptor NMDA recebe seu nome, causa uma diminuição na expressão de subunidades NR-1 e NR-3A desse receptor em culturas celulares de neurônios (Gascon et al., 2005; Rao et al., 2007).

Outras evidências de que o sistema glutamatérgico está alterado no TAB provém de estudos demonstrando a ação dos estabilizadores do humor nesse sistema. O tratamento crônico com lítio ou ácido valpróico diminui os níveis sinápticos de glutamato através de diversos mecanismos (Sanacora et al., 2008). Ambos os medicamentos têm o efeito de diminuir a expressão da subunidade GluR1 dos receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) no hipocampo com o tratamento prolongado e em doses clinicamente relevantes (Du et al., 2003). Suporte adicional a essa evidência vem de estudos recentes indicando que antagonistas dos receptores AMPA atenuam vários comportamentos maniformes produzidos pela administração de anfetamina a ratos (Hotsenpiller et al., 2001; Bäckström; Hyytiä, 2003). Lítio parece aumentar a excitabilidade neuronal nas sinapses da região CA1 do hipocampo (Valentin et al., 1997; Colino et al., 1998), aumentando a eficácia dessas vias. Isso parece ocorrer pela capacidade do lítio de potencializar correntes através dos receptores AMPA, através do aumento seletivo da abertura dos desses canais (Gebhardt; Cull-Candy, 2010). Lamotrigina, um medicamento usado para prevenir e tratar

episódios depressivos no TAB, inibe a liberação do glutamato no hipocampo de ratos (Leach et al., 1996). Riluzole, outra substância que inibe a liberação de glutamato na sinapse, apresentou efeito antidepressivo em estudos preliminares (Zarate et al., 2005; Sanacora et al., 2007). Em suma, os achados acima contribuem para a hipótese de que os níveis de glutamato estão aumentados no TAB e que parte da eficácia dos estabilizadores do humor seja proveniente de um efeito na neurotransmissão glutamatérgica.

Em resumo, os estudos mais atuais sobre a fisiopatologia do TAB têm identificado diversas alterações macroscópicas em áreas e circuitos cerebrais, além de alterações histopatológicas e químicas, nos níveis tecidual, intracelular e sináptico associadas à doença. Uma hipótese fisiopatológica da doença sugere que as disfunções nas cascatas bioquímicas intracelulares, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial prejudicam os processos ligados à plasticidade neuronal, levando à lesão celular e à consequente perda de tecido cerebral que tem sido identificada nos estudos de postmorte e de neuroimagem. Portanto, se considerarmos que as alterações primárias ocorrem na química intracelular, faz-se muito importante o estudo do TAB através da ERM. Como veremos, os metabólitos estudados por esse método podem fornecer pistas importantes sobre os processos ligados ao metabolismo energético celular, à via intracelular do fosfatidilinositol, à neurotransmissão e metabolismo glutamatérgico, além de fornecer medidas de vulnerabilidade celular. No entanto, antes de apresentarmos a literatura da ERM, analisaremos por que o estudo específico do hipocampo é de grande importância para o esclarecimento da fisiopatologia do TAB.

1.3 O hipocampo

O hipocampo está localizado no lobo temporal medial, em ambos os hemisférios. Trata-se de uma protuberância no solo do corno temporal do ventrículo lateral. É uma estrutura mais larga na parte rostral, onde apresenta uma discreta rotação para a linha média. Essa porção mais rostral é formada por dois a cinco giros e é conhecida como *pes hippocampi*. Seguindo-se para a porção mais distal, há um afunilamento da estrutura e essa porção é chamada de corpo do hipocampo (figura 1) (Amaral; Lavenex, 2007). O hipocampo faz parte de um sistema funcional maior chamado de formação hipocampal que inclui também o giro dentado, subiculum, presubiculum, parasubiculum e o córtex entorhinal. O hipocampo propriamente dito é uma área citoarquitetônica distinta e se restringe às regiões CA1, CA2 e CA3 (CA = Corno de Amon). Ele apresenta uma arquitetura neuronal elegante que tem encantado neuroanatomistas desde os primeiros estudos de Camilo Golgi, que desenvolveu um novo método para corar os neurônios e identificou a disposição simples e metódica das principais conexões do hipocampo (Golgi et al., 2001) (figura 2a). Trata-se de uma estrutura com três camadas, sendo uma camada única de neurônios principais entre duas plexiformes ricas em fibras.

Fonte: Amaral e Lavenex, 2007

Figura 1 - Anatomia da formação hipocampal e estruturas adjacentes

A disposição neuronal do hipocampo é singular, visto que a passagem de informações através dos circuitos intra-hipocampais é praticamente unidirecional, o que difere do restante do córtex cerebral, que, em geral, apresenta conexões recíprocas. Seus estudos mais antigos enfatizavam as três primeiras conexões do hipocampo e nomearam essas ligações como “circuito tri-sináptico”. Trata-se de um circuito excitatório

poderoso que é composto pelas conexões do córtex entorhinal com o giro dentado, desse com a área CA1 e dessa com a área CA3. Esse circuito tri-sináptico não levava em conta a importância do subiculum e córtex entorhinal no sistema, dado que as conexões para essas áreas foram descobertas posteriormente, inclusive as conexões do córtex entorhinal para o neocórtex. Hoje se sabe que o circuito tri-sináptico é apenas parte do todo e que o subiculum é a área que tem projeções para as áreas subcorticais e o córtex entorhinal projeta principalmente para o neocórtex (Amaral; Lavenex, 2007).

(a)

(b)

Fonte: Amaral e Lavenex, 2007

Figura 2 - Figuras representando a disposição dos neurônios e as conexões internas do hipocampo

- a) Desenho da arquitetura neuronal do hipocampo feito por Camilo Golgi;
 b) Circuito intra-hipocampal unidirecional do hipocampo, giro dentado, subiculum e córtex entorhinal. DG = Giro dentado, CA = Corno de Amon, Sub = subiculum, Para = parasubiculum, Pre = presubiculum.

O hipocampo é uma região do cérebro para onde convergem informações sensoriais multimodais já processadas em várias áreas do neocórtex. As informações são comparadas com outras nos circuitos internos do hipocampo e o resultado processado é

reenviado para diversas áreas do córtex cerebral. A região que recebe as vias neuronais vindas do neocórtex é principalmente o córtex entorhinal. Neurônios das camadas superficiais dessa região projetam-se para o giro dentado, formando a chamada via perfurante. Os neurônios do giro dentado (células granulares) dão origem a projeções para as células piramidais da região CA3 do hipocampo, chamadas de *mossy fibers*. As células piramidais da região CA3 enviam projeções para a região CA1, através das colaterais Schaffer. Os neurônios do CA1 projetam-se para o subiculum, sendo essa a principal via de saída excitatória do hipocampo. O CA1 também se projeta para o córtex entorhinal, como também o faz o subiculum, que tem projeções para as camadas mais profundas do córtex entorhinal. Isso fecha o *looping* do hipocampo, iniciado nas camadas superficiais do córtex entorhinal e terminando nas suas camadas profundas (figura 2b). A camada principal de neurônios no giro dentado é composta por células granulares. Já nas áreas CA1, CA2 e CA3, a camada principal é composta por neurônios piramidais. Em ambas as regiões existem outros neurônios menos importantes e interneurônios acima e abaixo das camadas principais de neurônios (Amaral; Lavenex, 2007).

É consenso hoje que a principal função do hipocampo é o seu papel na memória. O hipocampo é a principal estrutura cerebral envolvida com formação e armazenamento de memórias declarativas (Stark, 2007). A associação íntima do hipocampo com a memória foi primeiramente observada em 1957, como resultado de uma cirurgia para tratamento de epilepsia temporal refratária. Após a retirada de ambos os hipocampus e regiões corticais adjacentes, o paciente H.M., como ficou conhecido, teve suas crises epiléticas reduzidas, mas passou a apresentar uma amnésia global e profunda que persistiu até sua morte em 2008. No início, a descrição desse paciente estimulou a

realização de inúmeros estudos com animais que confirmaram o papel do hipocampo no campo da memória declarativa.

A memória pode ser dividida em de curta e de longa duração. A memória de curta duração é mais limitada e dura de segundos até 1 minuto e a de longa duração pode guardar enormes quantidades de informação e ter duração ilimitada. A memória de longa duração pode ser dividida em não-declarativa (implícita) e declarativa (explícita). A primeira diz respeito às habilidades motoras e hábitos e é mediada pelo neocórtex e pelo cerebelo. A segunda pode ser dividida em: 1) semântica, quando são armazenados os significados e conhecimentos sobre fatos independentes do contexto onde foram aprendidos e 2) episódica, que diz respeito à memorização de fatos pessoalmente vivenciados no seu contexto têmporo-espacial. As bases biológicas dos processos de memória de longa duração têm sido descritas e o principal processo associado é a *long term potentiation* (LTP) (Izquierdo et al., 2008). A LTP foi primeira descrita no hipocampo, mas hoje se sabe que pode ocorrer em diversas áreas do cérebro. Trata-se de modificações plásticas das sinapses que podem durar de dias a meses após a influência de um estímulo. Esse processo biológico associado à memória é mediado pela neurotransmissão glutamatérgica, principalmente por seu efeito sobre o receptor NMDA. Esse processo se inicia com a liberação de glutamato na fenda sináptica. O glutamato estimula os receptores NMDA, o que provoca a entrada de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico. As altas concentrações de cálcio ativam a enzima CaM kinase II através da calmodulina. A CaM kinase II ativada pode fosforilar receptores AMPA o que os torna mais ativos e aumenta a entrada de cálcio. A presença de altas quantidades de cálcio também ativa segundos mensageiros como a MAPK e a CaM kinase IV, que estimulam a expressão gênica, provavelmente pela ativação do fator transcritor conhecido como CREB. Essa ativação gênica resulta em produção proteica que leva à

síntese de componentes sinápticos, brotamento neuronal e formação de novos circuitos (Miyamoto et al., 2006).

Outro aspecto importante associado ao hipocampo é a formação de novos neurônios (neurogênese) no seu interior. Até recentemente a existência de neurogênese no cérebro adulto não era reconhecida. Apesar de trabalhos da década de 60 terem identificado a presença de reprodução celular em neurônios, foi apenas no ano 2000 que a neurogênese no cérebro humano adulto foi aceita amplamente e reconhecida em duas áreas: hipocampo e zona subventricular das paredes dos ventrículos laterais (Gross, 2000). No hipocampo, a neurogênese ocorre no giro dentado (Becker; Wojtowicz, 2007) e tem sido associada a formas complexas de memória espacial ou associativa (Koehl et al., 2011). Além disso, tem sido postulado um papel da neurogênese na fisiopatologia dos transtornos do humor. Por exemplo, estudos em animais têm demonstrado que o lítio exerce o papel de promover a neurogênese no hipocampo de adultos (Chen et al., 2000; Wexler et al., 2008) e o mesmo parece ocorrer como um efeito de medicações antidepressivas (Surget et al., 2011). Existem, no entanto, poucos estudos sobre o tema, e uma possível associação da neurogênese com a regulação do humor ainda não está comprovada. Independente do papel da neurogênese, o hipocampo é essencial na regulação dos estados afetivos e do comportamento emocional, através da função de memória, que possibilita a comparação do momento atual com experiências semelhantes do passado, favorecendo que o indivíduo apresente respostas emocionais apropriadas ao contexto (Phillips et al., 2003).

O hipocampo tem sido associado, mais recentemente, à regulação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o que levaria à diminuição dos efeitos do estresse sobre o organismo (McEwen; Magarinos, 2001). Evidências sugerem que essa função

do hipocampo também pode estar associada à regulação da neurogênese (Schloesser et al., 2009).

Outra função importante associada ao hipocampo é a de navegação espacial. Experimentos com ratos em movimento demonstram que os neurônios granulares e piramidais funcionam como “células de localização”, ou seja, elas têm a preferência por disparar em locais particulares, quando os ratos realizam movimentos exploratórios e passam a disparar em série à medida que o rato se movimenta, ou seja, a rede neuronal do hipocampo é capaz de armazenar uma representação neuronal do espaço, quando existe movimento (Neves et al., 2008).

Em resumo, o hipocampo consiste em uma estrutura cerebral que tem vasta conexão com o neocórtex e com outras áreas do sistema límbico, como a amígdala. Sua principal função está relacionada à memória, contudo estudos recentes têm atribuído a ele um papel também na regulação do estresse e do humor. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel da neurogênese nesse processo.

1.4 O estudo do Hipocampo no TAB

Diversos estudos têm investigado o hipocampo e têm implicado essa estrutura na fisiopatologia do TAB (Ng et al., 2009). Como vimos anteriormente, apesar da expectativa inicial de que o hipocampo apresentasse uma diminuição do volume no TAB, como foi consistentemente encontrada no transtorno depressivo maior (Campbell et al., 2004), a maior parte dos estudos de neuroimagem estrutural não encontrou alterações de volume no hipocampo (Ng et al., 2009). No entanto, outros estudos sugerem que possíveis achados de diminuição do volume tenham sido obscurecidos pela influência do lítio (Yucel et al., 2007; Hallahan et al., 2011).

À parte dos estudos de volume, pesquisas que investigaram o nível celular, a função e a neuroquímica da região têm encontrado alterações significativas no hipocampo de portadores de TAB (Al-Mousawi et al., 1996; Benes et al., 1998; Curtis et al., 2001; Ketter et al., 2001; Lagopoulos; Malhi, 2007; Liu et al., 2007; Malhi et al., 2007; Pavuluri et al., 2007). Estudos de contagem celular descreveram uma redução no número de neurônios não-piramidais na subregião CA2 (Benes et al., 1998) e também uma redução no tamanho dos neurônios na região CA1 (Liu et al., 2007). Estudos de tomografia por emissão de pósitrons demonstraram um aumento na captação de glicose em pacientes em mania (Al-Mousawi et al., 1996) e aumento no metabolismo da glicose em pacientes com depressão bipolar (Ketter et al., 2001) ao investigarem o hipocampo. Maior ativação dessa região em bipolares também foi encontrada, em resposta a diferentes tarefas (Curtis et al., 2001; Lagopoulos; Malhi, 2007; Malhi et al., 2007; Pavuluri et al., 2007) utilizando a ressonância magnética funcional. Estudos de neuropsicologia também têm identificado que os portadores de TAB apresentam déficits claros na memória declarativa, o que tem sido frequentemente associado ao prejuízo no funcionamento do hipocampo (Glahn et al., 2005; Bearden et al., 2006).

Em resumo, estudos de neuroimagem estrutural e funcional, de neuropatologia e de neuropsicologia têm implicado o hipocampo na fisiopatologia do TAB. No entanto, não é possível identificar com clareza, até o momento, quais alterações estão presentes desde o início da doença e quais são consequência da progressão da mesma. Além disso, fatores como estado do humor e uso de medicamentos podem interferir nos resultados, tornando mais complexa a tarefa de esclarecer o papel do hipocampo na fisiopatologia do TAB.

1.5 A espectroscopia de próton por ressonância magnética (^1H -ERM)

A espectroscopia de próton por ressonância magnética é um método não invasivo que permite a investigação da neuroquímica cerebral *in vivo*. Esse método de investigação pode ser usado em regiões específicas do cérebro, e utilizar pacientes durante estados do humor diferentes, em uso ou não de medicação. ^1H -ERM usa os mesmos princípios da ressonância magnética nuclear (RMN), embora os metabólitos de interesse produzam um sinal de intensidade 10.000 vezes menor que o sinal proveniente da água, que é medido na RMN. De acordo com os princípios da RMN, o núcleo de algumas espécies de átomos possui propriedades eletromagnéticas. Uma dessas propriedades chama-se rotação nuclear, e consiste no movimento intrínseco do núcleo ao redor de um eixo. Este movimento ocorre em átomos cuja soma de prótons e nêutrons no núcleo (peso atômico) é ímpar. Um dos isótopos do hidrogênio, o próton, que tem um próton e zero nêutron no núcleo, possui essa propriedade de rotação nuclear e pode ser examinado pela ERM. O fato de esse isótopo estar presente em 99,9% de todos os átomos de hidrogênio faz dele a escolha natural para o uso da ERM, que, nesse caso, é chamada de ERM de próton.

A rotação nuclear é associada a um campo magnético e pode ser representada por um vetor que tem uma magnitude e um eixo de rotação com orientação definidos. Quando um indivíduo é colocado dentro de campos magnéticos muito intensos, como os produzidos por aparelhos de RMN, os vetores que indicam a orientação da rotação dos núcleos se alinham na mesma direção do campo magnético do aparelho. Após esse alinhamento, um pulso de radio-frequência (RF) perturba os átomos alinhados e seus vetores eletromagnéticos mudam de direção. Ao cessar o pulso de RF e voltarem para a posição anterior, os átomos dos tecidos emitem uma oscilação de RF que é captada por

um conversor. A leitura desses sinais é feita após a amplificação e sua transferência para um computador, onde serão analisados com o auxílio de um software específico. As ondas de RF emitidas pelos prótons de H^+ contidos em determinadas moléculas (chamadas no meio de metabólitos) são captadas e quantificadas em termos de frequência e amplitude do sinal. O número de prótons de H^+ contidos na estrutura química do metabólito determina a frequência e a posição dele no eixo de frequência final. A amplitude do sinal determina a concentração do metabólito no tecido estudado. O produto final é um espectro que apresenta cada metabólito diferente em uma posição fixa do eixo e reflete a composição química do tecido (figura 3).

Figura 3 - Espectro produzido por exame de 1H -ERM

A figura mostra os os metabólitos medidos pela 1H -ERM e identifica a localização deles no eixo de frequência e a sua amplitude. ml = mio-Inositol, Cho = compostos de colina, Cr = creatina, Glu = glutamato, NAA = N-acetil-aspartato

Existem duas técnicas para a realização da ERM: 1) a técnica de voxel único (VU), na qual um pequeno volume é selecionado e um espectro é obtido a partir dele e

2) a técnica de multi-voxel (MV), na qual um volume maior é examinado por múltiplos voxels adjacentes e vários espectros podem ser obtidos de uma área maior em um único exame. Nos últimos anos, os pesquisadores da área valorizam a técnica de VU, porque ela tem uma razão sinal/ruído mais eficiente e demonstra ser uma técnica mais robusta. A desvantagem é que apenas um espectro é obtido e, portanto, a localização exata dele é essencial e pode levar a erros de interpretação caso seja feita incorretamente. Na técnica de MV, diferentes áreas cerebrais podem ser examinadas, diminuindo o erro associado à localização inadequada do voxel. No entanto, isso é feito às custas de uma diminuição da razão sinal/ruído e um maior tempo de exame. Ambas as técnicas utilizam sequências de pulsos especializadas e as mais utilizadas são a *point resolved spectroscopy* (PRESS) e a *stimulated echo acquisition mode* (STEAM).

Metabólitos, tais como N-acetil-aspartato (NAA), compostos de colina (GPC+PC), fosfocreatina mais creatina (PCr+Cr), mio-inositol (mI), glutamato mais glutamina (Glx), entre outros, podem ser medidos (Lyoo; Renshaw, 2010). Os metabólitos estão ligados às funções específicas das células e à neurotransmissão. A investigação desses metabólitos pode auxiliar no entendimento de diversos aspectos da bioquímica celular cerebral e auxiliar no esclarecimento da fisiopatologia do TAB.

O NAA está presente em altas concentrações no cérebro humano, sendo o segundo aminoácido mais abundante, atrás apenas do glutamato. Ele é sintetizado a partir da acetil-coenzima-A e do aspartato. A reação é catalisada pela enzima L-aspartato-N-acetil transferase e ocorre no interior da mitocôndria. A produção desse aminoácido ocorre apenas em neurônios e, portanto, a sua alteração está associada a alterações específicas dessas células. O NAA é considerado um marcador neuronal e a sua redução está associada à disfunção neuronal. Os estudos iniciais consideravam que os níveis de NAA refletiam perdas neuronais irreversíveis, no entanto, evidências

posteriores têm associado as alterações de NAA à disfunção neuronal reversível (Demougeot et al., 2004). Além disso, estudos recentes tem sugerido que os níveis de NAA refletem o funcionamento da fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria e, portanto, o metabolismo energético celular. Estudos que causaram diminuição na produção de NAA através do uso de inibidores da respiração mitocondrial ou lesão cerebral demonstraram que ocorre uma diminuição da produção de ATP na mesma proporção (Bates et al., 1996; Signoretti et al., 2001). Esses achados indicam que a diminuição de NAA reflete também uma diminuição da produção de energia pela mitocôndria. Há também evidências que sugerem que o NAA tem um papel na regulação da osmolaridade cerebral (Moffet et al., 2007). Uma redução do NAA tem sido observada em muitas doenças neurológicas que causam degeneração neuronal e axonal, tais como epilepsia, demências, acidentes vasculares cerebrais, hipóxia e esclerose múltipla (Moffett et al., 2007). Além da associação com doenças, tem sido demonstrado que os níveis de NAA no cérebro aumentam durante o desenvolvimento infantil e diminuem com a idade avançada (Van der Knapp et al., 1990). A ressonância do metabólito NAA forma o pico mais proeminente do espectro produzido pela ^1H -ERM no cérebro saudável e também no TAB. Este ocorre a 2,02 partes por milhão (ppm) no espectro e sua concentração no cérebro humano está em torno de 8 a 10 mmol/L (Bluml, 1999). Esse pico recebe uma pequena contribuição do peptídeo N-acetil-aspartato-glutamato (NAAG) (Pouwels; Frahm, 1997).

O sinal de colina é uma soma de diferentes compostos que contém colina. Os principais componentes do sinal medido na ^1H -ERM são os fosfolipídios solúveis da membrana celular, incluindo a fosfocolina (PC) e a glicerofosfocolina (GPC) (Miller et al., 1996). A PC é utilizada na síntese de fosfolipídios da membrana, enquanto que a GPC é o produto de degradação de fosfolipídios de membrana (Brenner et al., 1993). A

colina livre e a acetilcolina contribuem com menos de 5% do sinal medido (Miller et al., 1996). A ressonância de GPC+PC é detectada no ponto 3,23 ppm do espectro. Os compostos de colina são, portanto, constituintes das membranas celulares e sua alteração reflete mudanças no metabolismo dessas membranas, sendo que o aumento do sinal sugere neurodegeneração. Um aumento dos níveis de GPC+PC tem sido encontrado na doença de Alzheimer, na hipóxia crônica e na epilepsia (Salibi; Brown, 1998).

O mI é um isômero do inositol e pertence à cascata de segundo mensageiro do fosfatidilinositol, cuja alteração tem sido associada à fisiopatologia do TAB (Berridge et al., 1989). Isso indica que, potencialmente, níveis alterados de mI no TAB podem refletir alterações nessa via de sinalização intracelular. Além disso, o mI está quase exclusivamente localizado na glia, sendo, portanto, um marcador desse tipo celular e do processo de gliose (Duarte et al., 2012). A ressonância do mI está localizada em 3,56 ppm do espectro.

Dá-se o nome de Glx a uma composição de aminoácidos que inclui o glutamato e a glutamina, além de uma ínfima quantidade de ácido gama-amino- butírico (GABA). Glx ressoa entre 2,1 e 2,4 ppm e é avaliada conjuntamente, porque é difícil a resolução separada desses metabólitos, apesar de isso ser possível com os aparelhos de campo magnético mais potente. Uma vez que o glutamato está presente principalmente em neurônios e a glutamina mais presente em células da glia, tem se considerado que a razão glutamina/glutamato pode refletir o funcionamento do ciclo glutamato-glutamina (Stork; Renshaw, 2005).

O sinal da creatina reflete a soma de creatina (Cr) e fosfocreatina (PCr) e as concentrações típicas no cérebro variam entre 6 e 8 mM (Salibi; Brown, 1998). PCr serve como reservatório e transportador de energia e é importante para manter os níveis

cerebrais de ATP constantes. Manutenção do equilíbrio entre Cr e PCr é regulada pela necessidade celular de usar os fosfatos de alta energia. Estudos recentes têm demonstrado que a suplementação de creatina melhora a função cerebral, em condições normais e de stress (Allen, 2012). A ressonância do PCr+Cr encontra-se em 3,02 ppm no espectro de ^1H -ERM e tem sido considerada como relativamente "constante" no cérebro normal (Pouwels; Frahm, 1998) e foi muitas vezes utilizada como valor de referência interna para cada pico do metabolito em estudos de ^1H ERM. Evidências de estudos recentes, contudo, indicam que os níveis cerebrais de Cr+PCr podem estar modificados em várias condições psiquiátricas, idade, região cerebral e uso de estabilizadores do humor (Stanley, 2002), o que tem levado ao abandono progressivo das medidas utilizando a PCr+Cr como denominador. Creatina também exerce um papel na regulação osmótica cerebral (Bothwell et al., 2001).

1.6 A ^1H -ERM no Transtorno Afetivo Bipolar

Muitos estudos utilizando a ^1H -ERM foram realizados até o momento no TAB, buscando contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia da doença. Em seguida, serão apresentados os resultados desses estudos, nas diversas áreas do cérebro (Tabela 1), com exceção do hipocampo que será visto na seção seguinte (Tabela 2).

1.6.1 N-acetil-aspartato (NAA)

O NAA é o metabólito mais investigado nos estudos de ^1H -ERM em pacientes com TAB. O primeiro a encontrar uma alteração desse metabólito foi o estudo de Winsberg et al. (2000), que investigou a razão NAA/PCr+Cr no CPFDL de pacientes

com TAB e em controles. Foram estudados 20 pacientes (com TAB tipo I e II), eutímicos e que estavam sem medicação por pelo menos duas semanas. Observou-se que os pacientes apresentavam níveis mais baixos de NAA. Os autores atribuíram o achado à presença de dano neuronal no CPFDL de pacientes com TAB. Posteriormente, outros estudos identificaram redução de NAA na região pré-frontal (Cecil et al., 2002), novamente no CPFDL (Molina et al., 2007), no lobo occipital (Bhagwagar et al., 2007) e gânglios da base (Frye et al., 2007b; Port et al., 2008) de pacientes com TAB.

Tabela 1 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton em portadores de transtorno afetivo bipolar

Estudos	N	Humor/ Medicação/ Doença (anos)	Regiões	Resultados
Sharma et al., 1992	4P/ 9C	M/ Sim/ ND	Gânglios da base e occipital	↑NAA/PCr+Cr ↑GPC+PC/PCr+Cr ↑mI/PCr+Cr
Lafer et al., 1994	19P/ 14C	E/ Sim/ ND	Gânglios da base	↑GPC+PC/PCr+Cr
Kato et al., 1996	19P/ 19C	E/ Sim/ ND	Gânglios da base à esquerda	= NAA/PCr+Cr ↑ GPC+PC/PCr+Cr
Hamakawa et al., 1998	18P/ 20C	D e E/ 14 sim, 4 não/ ND	Gânglios da base à esquerda	= NAA = NAA/PCr+Cr ↑ GPC+PC ↑ GPC+PC/PCr+Cr
Ohara et al., 1998	10P/ 10C	E/ 7 sim, 3 não/ ND	Gânglios da base	= NAA/PCr+Cr = GPC+PC/PCr+Cr
Hamakawa et al., 1999	23P/ 20C	E/ 19 sim, 4 não/ ND	Córtex frontal bilateral	= NAA = GPC+PC ↓ PCr+Cr
Moore et al., 2000	12P/ 9C	D/ Não/ ND	Lobos frontal, temporal, occipital e parietal	= NAA

continua

Tabela 1 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton em portadores de transtorno afetivo bipolar (continuação)

Estudos	N	Humor/ Medicação/ Doença (anos)	Regiões	Resultados
Moore et al., 2000	9P/ 14C	D/ Sim/ ND	Cíngulo anterior	↑ GPC+PC/PCr+Cr = mI/PCr+Cr
Winsberg et al., 2000	20P/ 20C	E/ Não/ 15	CPFDL bilateral	↓ NAA/PCr+Cr ↓ NAA/GPC+PC = GPC+PC
Deicken et al., 2001	15P/ 15C	E/ 13 sim, 2 não/ 22,1	Tálamo bilateral	↑ NAA = GPC+PC = PCr+Cr
Cecil et al., 2002	17P/ 21C	M e MT/ Sim/ 5	Prefrontal medial	↓ NAA = GPC+PC = PCr+Cr = mI
Michael et al., 2003	8P/ 8C	M/ 6 sim, 2 não/ ND	CPFDL à esquerda	= NAA = GPC+PC ↑ Glx = PCr+Cr
Dager et al., 2004	29P/ 24C	D/ Não/ 13,5	Frontal/ cíngulo/ caudado/ putâmen/ tálamo/ ínsula/ parietal/ occipital	= NAA = GPC+PC ↑ Glx = PCr+Cr
Wu et al., 2004	25P/ 18C	E/ Sim/ ND	Lobo temporal	↓ GPC+PC/PCr+Cr
Brambilla et al., 2005	10P/ 32C	D e E/ 6 sim, 4 não/ 15,9	CPFDL à esquerda	= NAA = GPC+PC = PCr+Cr
Frey et al., 2005	10P/ 10C	M e MT/ Sim/ 12	CPFDL bilateral	= NAA (e /PCr+Cr) = GPC+PC (e /PCr+Cr) = PCr+Cr = mI (e /PCr+Cr)
Amaral et al., 2006	13P/ 15C	E/ Sim/ 10,5	Cíngulo anterior	= NAA/PCr+Cr = GPC+PC/PCr+Cr

continua

Tabela 1 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton em portadores de transtorno afetivo bipolar (continuação)

Estudos	N	Humor/ Medicação/ Doença (anos)	Regiões	Resultados
Molina et al., 2007	13P/ 10C	E/ Sim/ 10,2	CPFDL à direita	↓ NAA/PCr+Cr = GPC+PC/PCr+Cr
Malhi et al., 2007	9P/ 9C	E e H/ 4 sim, 5 não/ ND	Frontal, cíngulo anterior, gânglios da base	= NAA = GPC+PC = mI
Bhagwagar et al., 2007	16P/ 18C	E/ Não /2	Parieto-occipital	↓ NAA/PCr+Cr ↑ Glx/PCr+Cr
Frey et al., 2007	32P/ 32C	H,D,M,E/ Não /10	CPFDL à esquerda	= NAA ↓ GPC+PC = Glx ↓ PCr+Cr
Frye et al., 2007a	23P/ 12C	D/ Sim/ 17,4	Cíngulo anterior/ prefrontal medial	= NAA = GPC+PC ↑ Glx ↑ PCr+Cr
Frye et al., 2007b	16P/ 17C	M/ Sim/ 17,2	Cíngulo anterior/ gânglios da base / Parieto-occipital	↓ NAA (/PCr+Cr) = GPC+PC (/PCr+Cr) = PCr+Cr (/PCr+Cr) = mI (/PCr+Cr) = Glx (/PCr+Cr)
Sarramea Crespo et al., 2008	17P/ 15C	E/ Sim/ 14	Cíngulo	= NAA/PCr+Cr = NAA/GPC+PC = GPC+PC/PCr+Cr
Öngür et al., 2008	15P/ 21C	M/ Sim/ 25,5	Cíngulo anterior/ córtex parieto-occipital	= NAA = GPC+PC = Glu = PCr+Cr
Scherk et al., 2008	13P/ 13C	E/ Sim/ 8,2	Tálamo/ putâmen	= NAA = GPC+PC = PCr+Cr = mI

continua

Tabela 1 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton em portadores de transtorno afetivo bipolar (continuação)

Estudos	N	Humor/ Medicação/ Doença (anos)	Regiões	Resultados
Port et al., 2008	21P/ 21C	M,D e E/ Não/ ND	Gânglios da base e subst. branca frontal	↓ NAA ↓ GPC+PC ↑ mI ↓ PCr+Cr ↓ Glx
Ongur et al., 2009	15P/ 22C	M/ Sim/ 10,8	Cíngulo anterior/ córtex parieto- occipital	= PCr+Cr
Senaratne et al., 2009	12P/ 12C	E/ 11 sim, 1 não/ 29,9	Cortex orbitofrontal, hipocampo, cortex occipital	= NAA ↑ GPC+PC = Glu
Scherk et al., 2009	33P/ 29C	E/ Sim/ ND	CPFDL à esquerda e cíngulo anterior	= NAA/GPC+PC = NAA/PCr+Cr = GPC+PC
Scherk et al., 2009	33P/ 29C	E/ Sim/ ND	CPFDL à esquerda e cíngulo anterior	= NAA/GPC+PC = NAA/PCr+Cr = GPC+PC
Kaufman et al., 2009	13P/ 11C	E/ Sim/ 18,4	Gânglios da base e cérebro total	= Glu
Shahana et al., 2011	25P/ 9C	E e MT/ 14 sim, 11 não/ ND	Putâmen	= PCr+Cr/GPC+PC
Brady et al., 2012	7P/ 6C	M e E/ Sim/ ND	Cíngulo anterior/ parieto-occipital	= NAA/PCr+Cr
Castillo et al., 2000	10P/ 10C	ND/ Não/ ND	Lobos frontais bilaterais/ gânglios da base bilaterais	= NAA/PCr+Cr = GPC+PC/PCr+Cr ↑ Glx/PCr+Cr
Cecil et al., 2003	9P/ 10C	E/ 1 sim, 8 não/ ND	Frontal medial/ vermis cerebelar	↓ NAA/GPC+PC = GPC+PC/PCr+Cr = PCr+Cr ↑ mI

continua

Tabela 1 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton em portadores de transtorno afetivo bipolar (conclusão)

Estudos	N	Humor/ Medicação/ Doença (anos)	Regiões	Resultados
Chang et al., 2003	15P/ 11C	E/ 14 sim, 11 não/ ND	CPFDL bilateral	↓ NAA/PCr+Cr e ↓ NAA/GPC+PC = GPC+PC/PCr+Cr = mI/PCr+Cr
Sassi et al., 2005	14P/ 18C	E e D/ 13 sim, 1 não/ 3,8	CPFDL à esquerda	↓ NAA = GPC+PC = PCr+Cr
Olvera et al., 2007	35P/ 36C	ND/ 24 sim, 11 não/ 4,3	CPFDL à esquerda	↓ NAA = GPC+PC = mI = PCr+Cr = Glx
Singh et al., 2010	20P/ 20C	E/ Sim/ ND	Cíngulo anterior	= NAA (/PCr+Cr) = mI (/PCr+Cr) = PCr+Cr ↓ Glu
Caetano et al., 2011	43P/ 38C	E, D, M, MT/ 31 sim, 12 não/ 3,9	Prefrontal medial/CPFDL/ cíngulo/occipital	↓ NAA ↓ GPC+PC ↓ PCr+Cr
Strawn et al., 2012	25P/ 15C	M e MT/ Sim/ ND	Cíngulo anterior/ prefrontal ventrolateral	= Glu = Glx

P = pacientes, C = controles, ND = dado não disponível, E = eutímia, M = mania, D = depressão, MT = misto, NAA = N-acetil aspartato, GPC+PC = compostos de colina, mI = mio-inositol, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, Glx = glutamato + glutamina, Glu = glutamato, CPFDL (córtex pré-frontal dorsolateral)

No entanto, muitos estudos não registraram diferenças entre os grupos de pacientes e controles. Três estudos iniciais que investigaram os gânglios da base obtiveram resultados negativos (Kato et al., 1996; Hamakawa et al., 1998, Ohara et al., 1998). Em seguida, Hamakawa et al. (1999) estudaram as regiões frontais bilaterais em 23 pacientes com TAB tipo I e II, todos eutímicos, e não encontraram diferença nos níveis de NAA entre os grupos. Esse resultado também ocorreu em outros estudos na

região frontal (Moore et al., 2000; Malhi et al., 2007), inclusive quando investigada a substância branca (Dager et al., 2004). Especificamente no CPFDL, Michael et al. (2003), Brambilla et al. (2005), Frey et al. (2005), Frey et al. (2007) e Scherk et al. (2009) não encontraram diferença entre os grupos de TAB e controles. Senaratne et al. (2009) também não encontraram diferença entre os grupos de pacientes eutímicos com TAB tipo I e II e controles ao investigar o córtex orbitofrontal. A região do cíngulo anterior também tem sido investigada desde que estudos de contagem celular encontraram diminuição da densidade de neurônios e glia nessa área (Ongur et al., 1998), mas os estudos de espectroscopia não encontraram diferenças nos níveis de NAA entre pacientes e controles (Amaral et al., 2006; Frye et al., 2007; Malhi et al., 2007; Ongur et al., 2008; Sarraimea et al., 2008; Brady et al., 2012).

Também há estudos que relataram aumento dos níveis de NAA. Michael et al. (2009) investigaram o CPFDL de pacientes bipolares com ciclagem rápida e sem ciclagem rápida. Em ambos os grupos (seis pacientes cada) houve aumento do NAA na comparação com controles. Nos pacientes com ciclagem rápida ocorreram níveis maiores que naqueles sem ciclagem rápida. Deicken et al. (2001) também encontraram aumento de NAA em 15 pacientes com TAB tipo I, eutímicos, ao investigar o tálamo bilateralmente, assim como Sharma et al. (1992) ao investigar os gânglios da base.

Os estudos em crianças e adolescentes com TAB são mais consistentes e demonstraram reduções dos níveis de NAA no CPFDL (Chang et al., 2003; Sassi et al., 2005; Olvera et al., 2007), na região prefrontal medial (Caetano et al., 2011), bem como no vermis cerebelar (Cecil et al., 2003). No entanto, Castillo et al. (2000), ao investigar as regiões frontais bilaterais de 10 pacientes pediátricos com TAB, não encontraram diferenças entre os grupos, o mesmo ocorrendo com Singh et al. (2010).

As concentrações reduzidas de NAA em pacientes com TAB, encontradas em alguns estudos, têm sido interpretadas como uma indicação de disfunção ou perda neuronal, o que seria consistente com os estudos de contagem celular que identificaram perdas neuronais e da glia em áreas cerebrais associadas ao TAB. Outra interpretação possível é que a diminuição do NAA esteja refletindo um prejuízo no metabolismo energético mitocondrial, o que seria consistente com os estudos que identificaram alterações mitocondriais e do estresse oxidativo nos pacientes com TAB. No entanto, há muitos estudos que não replicaram esses achados, inclusive nas mesmas áreas cerebrais. É possível que diversos fatores contribuam para os resultados contraditórios encontrados até o momento, principalmente na população de adultos, tais como a heterogeneidade das amostras estudadas quanto ao diagnóstico e anos de doença, as diferentes técnicas de ERM, a presença ou ausência de medicações e a presença de estados de humor distintos.

1.6.2 Compostos de colina (GPC+PC)

Alterações das concentrações de GPC+PC têm sido encontradas em alguns estudos de ^1H -ERM com pacientes portadores de TAB. Lafer et al. (1994) encontraram aumento de GPC+PC nos gânglios da base de pacientes portadores de TAB. Kato et al. (1996) investigaram 19 pacientes eutímicos com TAB (tipo I e II) e encontraram aumento dos níveis de GPC+PC/PCr+Cr em relação aos controles, nos gânglios da base à esquerda. Não houve diferença entre o grupo de pacientes tratados com lítio ($n = 10$) e os pacientes sem tratamento medicamentoso ($n = 9$). Hamakawa et al. (1998) e Sharma et al. (1992) também encontraram aumento do sinal de GPC+PC nos gânglios da base de pacientes portadores de TAB. Moore et al. (2000) relataram que pacientes bipolares

apresentam maiores níveis de GPC+PC no cíngulo anterior quando comparados com controles. Senaratne et al. (2009) encontraram aumento de GPC+PC na região orbitofrontal de pacientes com TAB. Em contraste, a redução dos sinais de GPC+PC também foi relatada em estudos no CPFDL (Frey et al., 2007), nas substâncias branca e cinzenta do lobo prefrontal medial (Cecil et al., 2002), no lobo temporal (Wu et al., 2004) e nos gânglios da base (Port et al., 2008). No entanto, a maior parte dos estudos que investigaram as áreas frontais e os gânglios da base não encontrou diferença nos níveis de GPC+PC entre pacientes com TAB e controles (Hamakawa et al., 1999; Winsberg et al., 2000; Deicken et al., 2001; Cecil et al., 2002; Michael et al., 2003; Dager et al., 2004; Brambilla et al., 2005; Frey et al., 2005; Amaral et al., 2006; Frye et al., 2007; Frye et al., 2007b; Malhi et al., 2007; Molina et al., 2007; Ongur et al., 2008; Saramea et al., 2008; Scherk et al., 2008; Scherk et al., 2009).

Em crianças e adolescentes portadores de TAB, os estudos ¹H-ERM não encontraram alterações nos níveis de GPC+PC relativos aos controles (Castillo et al., 2000; Cecil et al., 2003; Chang et al., 2003; Sassi et al., 2005; Olvera et al., 2007), com exceção do estudo realizado por Caetano et al. (2011) que observaram níveis mais baixos de GPC+PC na região prefrontal medial bilateral.

O aumento dos níveis de GPC+PC, encontrado por alguns estudos, pode refletir um prejuízo no metabolismo das membranas fosfolipídicas em pacientes bipolares e uma possível neurodegeneração associada à doença. No entanto, este achado não foi replicado pela maioria dos estudos, em adultos e na população pediátrica. Não está claro o quanto fatores como tempo de doença, humor, uso de medicamentos e técnicas distintas de ERM contribuíram para os resultados heterogêneos.

1.6.3 Mio-Inositol (mI)

Poucos estudos investigaram as concentrações de mI em pacientes com TAB e controles, utilizando a ^1H -ERM. Frye et al. (2007) pesquisaram o cíngulo anterior e a região prefrontal medial de 36 pacientes com TAB tipo I e II, todos depressivos e medicados e compararam com 12 controles. Não foi identificada diferença entre os grupos. Malhi et al. (2007) investigaram nove pacientes com TAB tipo I no cíngulo, substância branca frontal e gânglios da base e não encontraram diferença nos níveis de mI entre pacientes e controles. A maioria dos estudos com mI procurou investigar os efeitos do lítio e de outros medicamentos nesse metabólito e serão discutidos posteriormente no texto. Em estudos com populações pediátricas, Cecil et al. (2003) investigaram pacientes com TAB e depressão maior (mas que tinham um parente de primeiro grau com TAB) e encontraram maiores níveis de mI em pacientes na região frontal medial. No entanto, Singh et al. (2010) investigaram os níveis de mI e não encontraram diferenças com controles no cíngulo anterior e Chang et al. (2003) e Olvera et al. (2007) obtiveram o mesmo resultado no CDLPF.

Em resumo, há poucos estudos que investigaram os níveis de mI entre pacientes com TAB e controles e apenas um, realizado em crianças, mostrou diferenças quanto aos níveis de mI. Mais estudos de ^1H -ERM são necessários para esclarecer o eventual papel do mI na fisiopatologia do TAB.

1.6.4 Glutamato + glutamina (Glx)

Vários estudos têm relatado níveis de Glx elevados em pacientes com TAB em relação a controles. Dager et al. (2004) estudaram 29 pacientes com TAB, em sua

maioria depressivos e sem medicação e encontraram níveis elevados de Glx na substância cinzenta do giro do cíngulo em relação aos controles. Em outro estudo, pacientes em mania aguda também apresentaram maiores níveis de Glx em relação a controles no CPFDL esquerdo (Michael et al., 2003). Da mesma forma, níveis de Glx/PCr+Cr foram mais elevados em pacientes não medicados e eutímicos na região parieto-occipital quando comparados com controles (Bhagwagar et al., 2007). Finalmente, Frye et al. (2007) encontraram aumento de Glx na região prefrontal medial e cíngulo anterior. No entanto, alguns estudos não encontraram alteração entre os grupos de pacientes com TAB e controles (Frey et al., 2007; Frye et al., 2007b; Ongur et al., 2008; Kaufman et al., 2009; Senaratne et al., 2009) e um estudo encontrou níveis mais baixos desse metabólito nos pacientes com TAB (Port et al., 2008). Uma meta-análise recente analisou os estudos realizados para a investigação de Glx e glutamato em pacientes com TAB e constatou que os níveis desses metabólitos foram maiores no grupo com a doença, quando todas as áreas frontais foram combinadas para a realização da análise (Gigante et al., 2012).

Os estudos com crianças e adolescentes apresentam resultados contraditórios. Castillo et al. (2000) encontraram que as crianças com TAB apresentam níveis elevados de Glx no frontal e em regiões dos gânglios da base em comparação com controles. Em contraste, Olvera et al. (2007) não encontraram alterações nos níveis cerebrais de Glx em 35 pacientes pediátricos portadores de TAB quando comparados com controles. Strawn et al. (2012) também não identificaram alterações do Glx e do glutamato em adolescentes ao pesquisarem o cíngulo anterior e a área prefrontal ventrolateral em pacientes em mania ou estado misto, o mesmo ocorrendo no estudo de Moore et al. (2007) na região pré-frontal. Em contraste com esses achados, um estudo de pacientes pediátricos com TAB demonstrou a presença de menores níveis de Glx/PCr+Cr na

região prefrontal em pacientes em episódio maníaco, quando comparados com pacientes clinicamente estáveis em uso de antipsicóticos atípicos (Moore et al., 2007b). Singh et al. (2010) também encontraram níveis mais baixos de glutamato no cíngulo anterior de crianças com TAB.

Em resumo, os estudos em adultos, em sua maioria, sugerem a existência de maiores níveis de Glx em áreas distintas dos cérebros de pacientes com TAB. Outros estudos em crianças e adolescentes são necessários para esclarecer o papel do glutamato e glutamina na fisiopatologia do TAB infantil.

1.6.5 Creatina (Cr) + fosfocreatina (PCr)

Os estudos iniciais de ^1H -ERM assumiam que esse metabólito não se alteraria com a doença e poderia ser utilizado como um fator normalizador entre os grupos estudados. No entanto, estudos com pacientes bipolares têm identificado alterações dos níveis de PCr+Cr nessa doença. Frey et al. (2007) investigaram 32 pacientes com TAB (20 com TAB tipo I e 12 com TAB tipo II) e encontraram redução dos níveis de PCr+Cr no CPFDL esquerdo em relação aos controles. Hamakawa et al. (1999) investigaram os córtex frontais bilaterais e relataram que a redução nos níveis de PCr+Cr ocorreu nos pacientes deprimidos em relação aos eutímicos e Port et al. (2008) encontraram redução de PCr+Cr nos gânglios da base. Por outro lado, Frye et al. (2007) relataram maiores níveis de PCr+Cr no córtex pré-frontal em pacientes com depressão bipolar do que nos indivíduos controles e Michael et al. (2009) obtiveram o mesmo resultado em pacientes bipolares cicladores e não cicladores rápidos quando comparados com controles. No entanto, há vários estudos que não encontraram alterações dos níveis de PCr+Cr em pacientes com TAB (Deicken et al., 2001; Cecil et al., 2002; Michael et al., 2003; Dager

et al., 2004; Brambilla et al., 2005; Frye et al., 2007; Ongur et al., 2008; Scherk et al., 2008; Ongur et al., 2009; Shahana et al., 2011).

Dois estudos em crianças e adolescentes encontraram uma tendência para diminuição da PCr+Cr em pacientes pediátricos com TAB, um no CPFDL esquerdo (Sassi et al., 2005) e outro no vermis cerebelar (Cecil et al., 2003). Caetano et al. (2011) encontraram uma redução da PCr+Cr em pacientes pediátricos com TAB nas áreas prefrontal medial esquerda e na substância branca do CPFDL esquerdo. Porém, estudos realizados no CPFDL esquerdo (Olvera et al., 2007) e no cíngulo anterior (Singh et al., 2010) não encontraram diferenças entre pacientes pediátricos e controles. Não há estudos que avaliaram o efeito dos medicamentos na PCr+Cr.

Em resumo, os estudos com PCr+Cr no TAB são inconclusivos. Novos estudos de ^1H -ERM são necessários para investigar se existe um papel desse metabólito na fisiopatologia do TAB.

1.6.6 Investigação do hipocampo em portadores de TAB através da ^1H -ERM

Oito estudos de ^1H -ERM foram realizados no hipocampo de portadores de TAB (tabela 2), todos em amostras de adultos. O achado mais consistente, observado em cinco desses estudos, é o da ocorrência de níveis mais baixos de NAA nesses pacientes, quando comparados com controles saudáveis, o que é um indicador de dano neuronal ou disfunção do metabolismo energético dos neurônios (Bertolino et al., 2003; Deicken et al., 2003; Atmaca et al., 2006; Scherck et al., 2008; Atmaca et al., 2012). O primeiro estudo que identificou níveis mais baixos de NAA em pacientes com TAB foi realizado por Bertolino et al. (2003). Os autores investigaram 11 áreas do cérebro, utilizando a ^1H -ERM multi-voxel e a única alteração encontrada ocorreu nos níveis de NAA do

hipocampo. Esse estudo possui como limitações o fato de não ter utilizado uma correção para a segmentação tecidual e não ter aplicado a correção para múltiplas comparações. Em seguida, Deicken et al. (2003) também identificaram níveis mais baixos de NAA nos pacientes com TAB. Todos pacientes tinham histórico familiar de TAB e estavam eutímicos. Também foi utilizada a técnica de multi-voxel, mas os autores reportaram apenas os achados do hipocampo. Como ponto forte, esse estudo realizou a segmentação do voxel. Atmaca et al. (2006) investigaram pacientes durante o primeiro episódio de mania, utilizando a técnica de multi-voxel e também encontraram a redução do NAA em pacientes com TAB. Os autores deram ênfase à possibilidade da alteração do NAA não estar relacionada à duração da doença, já que ocorreu em pacientes de primeiro episódio. Scherk et al. (2008) foram os primeiros a encontrar a presença de níveis baixos de NAA utilizando a técnica de voxel único para investigar o hipocampo de pacientes com TAB. Os pacientes estavam eutímicos e tinham 8,2 anos de doença. O outro estudo que encontrou redução de NAA foi realizado por Atmaca et al. (2012) e investigou pacientes com depressão bipolar, utilizando a técnica de multi-voxel. Apesar da maioria dos estudos ter identificado a presença de níveis mais baixos de NAA, um estudo encontrou resultados opostos, ou seja, níveis mais altos de NAA (Iosifescu et al., 2009). Este achado foi atribuído ao efeito neuroprotetor dos medicamentos estabilizadores do humor. Outros dois estudos não apontaram diferenças entre pacientes e controles (Colla et al., 2009; Senaratne et al., 2009). Dos cinco estudos que encontraram diminuição da NAA, quatro utilizaram medidas normalizadas pela PCr+Cr (mediram a razão NAA/PCr+Cr), o que, como observado acima, pode ter influenciado nos resultados, porque há estudos que identificaram alterações de PCr+Cr em pacientes com TAB, inclusive no hipocampo. Também chama a atenção que quatro estudos utilizaram a técnica de multi-voxel. Nesses estudos, múltiplas áreas são investigadas e é

importante que se realizem correções para múltiplas comparações para que possam ser evitados resultados falso-positivos. Portanto, apesar da maioria dos estudos ter encontrado reduções de NAA, há limitações dos estudos que colocam em questão esses achados.

Em relação à GPC+PC, três estudos no hipocampo encontraram níveis mais altos desse metabólito (Iosifescu et al., 2009; Senaratne et al., 2009; Atmaca et al., 2012), o que poderia indicar um maior dano das membranas fosfolipídicas celulares no hipocampo de pacientes com TAB. No entanto, outros cinco estudos não encontraram diferenças entre pacientes e controles (Bertolino et al., 2003; Deicken et al., 2003; Atmaca et al., 2006; Sherck et al., 2008; Colla et al., 2009). Não há estudos no hipocampo que encontraram níveis mais baixos de GPC+PC. Mais estudos são necessários para esclarecer os resultados contraditórios detectados para os níveis de GPC+PC no hipocampo de pacientes com TAB.

Quanto ao glutamato, Colla et al. (2009) encontraram níveis mais altos desse metabólito, o que está de acordo com a maioria dos estudos em outras áreas do cérebro. Semelhante achado pode indicar uma maior neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo ou alterações no metabolismo celular, que levariam a uma maior produção de glutamato. Outro estudo investigou o glutamato, na forma de Glx, e não encontrou alterações entre pacientes e controles (Senaratne et al., 2009). Portanto, novos estudos de ¹H-ERM são necessários para investigar mais precisamente o glutamato no hipocampo.

Quanto à PCr+Cr, Deicken et al. (2003) encontraram níveis mais baixos desse metabólito no hipocampo de portadores de TAB, indicando possível depleção do reservatório de energia celular e um baixo funcionamento energético da célula. No entanto, Iosifescu et al. (2009), encontraram resultados opostos e Colla et al. (2009) não

encontraram diferenças entre os grupos. Mais estudos com esse metabólito são necessários para esclarecer o papel da creatina no hipocampo de portadores de TAB. Mio-inositol foi pesquisado no hipocampo apenas por um estudo (Scherk et al., 2008), todavia não houve diferença entre pacientes e controles.

Em suma, existem oito estudos no hipocampo, todos realizados em amostras com poucos pacientes (12 a 21 sujeitos). Cinco foram realizados em pacientes eutímicos, um em pacientes maníacos, um em pacientes depressivos e um em pacientes em diferentes estados de humor na mesma amostra. Há relatos da influência do uso de medicações e do estado do humor nos resultados. Apenas três estudos foram realizados com equipamentos de campo magnético maior que 1,5T (Colla et al., 2009; Iosifescu et al., 2009; Senaratne et al., 2009).

Há certamente fatores confundidores que têm contribuído para alguns resultados pouco consistentes apresentados acima, tais como o uso de medicamentos, a realização de protocolos distintos para obtenção de ERM e a inclusão de pacientes em diferentes estados de humor e estágios da doença. Uma das estratégias utilizadas para diminuir a heterogeneidade da amostra é o estudo de grupos de pacientes nos estágios iniciais da doença. Há apenas um estudo que investigou uma amostra de pacientes no primeiro episódio de mania. Trata-se do estudo, já citado, de Atmaca et al. (2006), que encontrou níveis mais baixos de NAA/PCr+Cr em 12 pacientes sem uso de medicação e em estado de mania aguda.

Tabela 2 - Estudos de espectroscopia por ressonância magnética de próton realizados no hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar

Estudos	N	Subtipo	Humor	Medicação	Anos de doença	Resultados
Bertolino et al., 2003	17P/ 17C	TAB I	VE	Sim	ND	↓ NAA/PCr+Cr = GPC+PC/PCr+Cr
Deicken et al., 2003	15P/ 20C	TAB I	E	Sim	18,7	↓ NAA, = GPC+PC ↓ PCr+Cr
Atmaca et al., 2006	12P/ 12C	TAB I	M	Não	ND	↓ NAA/PCr+Cr = GPC+PC/PCr+Cr
Scherk et al., 2008	13P/ 13C	TAB I	E	Sim	8,2	↓ NAA/PCr+Cr = GPC+PC/PCr+Cr = mI/PCr+Cr
Senaratne et al., 2009	12P/ 12C	TAB I e II	E	Sim	29,9	= NAA ↑ GPC+PC = Glx
Colla et al., 2009	21P/ 19C	TAB I	E	Sim	ND	= NAA = GPC+PC = PCr+Cr ↑ Glu
Iosifescu et al., 2009	18P/ 10C	ND	E	Sim	ND	↑ NAA ↑ GPC+PC ↑ PCr+Cr
Atmaca et al., 2012	13P/ 13C	TAB I	D	Sim	ND	↓ NAA/GPC+PC ↑ GPC+PC/PCr+Cr

VE = vários episódios, E = eutímia, M = mania, D = depressão, ND = dado não disponível

1.7 O estudo de indivíduos com TAB após o primeiro episódio de mania

O estudo de pacientes no início da doença fornece uma chance única de identificar processos fisiopatológicos sem a influência das alterações causadas pela progressão da doença e por anos de tratamento farmacológico. Recentemente, ganhou novo impulso a ideia de que o TAB é uma doença progressiva (Kessing et al., 2004; Dienes et al., 2006; Post et al., 2010), mas Kraepelin, há cerca de um século atrás, já havia descrito uma tendência da doença progredir com o tempo (Kraepelin, 1921). Contribuem para esta hipótese os achados de que no TAB há uma redução na duração interepisódica a cada recorrência da doença (Roy-Byrne et al., 1985; Kessing et al., 1998) e o fato de um maior número de episódios estar associado a uma pior resposta ao lítio (Franchini et al., 1999) e à terapia cognitiva comportamental (Scott et al., 2006). A concepção de que o TAB é uma doença progressiva tem levado à busca de marcadores neurobiológicos de estadiamento da doença e também à consideração de que estágios diferentes da doença possuem alterações distintas na sua fisiopatologia (Andreazza et al., 2009; Kapczinski et al., 2009; Berk et al., 2010a).

O conhecimento das alterações presentes já no início da doença também pode contribuir para identificar alvos para intervenções clínicas e psicossociais precoces. Um estudo recente defende que pacientes recém-diagnosticados com TAB devem ser submetidos a intervenções amplas e efetivas, o mais rápido possível, para prevenir o prejuízo posterior que pode ser causado pela progressão da doença (Berk et al., 2010b).

Não existem estudos de ^1H -ERM no hipocampo de pacientes com TAB logo após o primeiro episódio da doença. Esse estudo poderá identificar se as alterações encontradas em outros estudos estão presentes ou não na fase inicial da doença.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos de ^1H -ERM realizados no hipocampo identificaram alterações de NAA, GPC+PC, PCr+Cr e glutamato em portadores de TAB. Tais achados sugerem a presença de alterações intracelulares específicas e do metabolismo ou neurotransmissão do glutamato no hipocampo desses indivíduos. Porém, não está claro se as alterações estão presentes desde o início da doença ou se elas representam uma consequência de sua progressão. A investigação através da ^1H -ERM de pacientes no início da doença pode auxiliar no esclarecimento dessa questão.

Apenas um estudo investigou a bioquímica do hipocampo em pacientes de primeiro episódio de mania (Atmaca et al., 2006). Porém, o estudo foi realizado durante o episódio de mania e os pacientes apresentavam sintomatologia aguda grave. Esse será o primeiro estudo a investigar os metabólitos em pacientes bipolares, na sua maior parte em remissão, logo após o primeiro episódio de mania.

Estudos prévios de ^1H -ERM, realizados no hipocampo, têm amostras pequenas de pacientes. O estudo de uma população maior permite a investigação adicional da influência de características clínicas, tais como estado do humor, uso de substâncias e de medicamentos.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o perfil bioquímico do hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar tipo I até três meses após apresentarem seu primeiro episódio de mania.

Objetivo Específico

Comparar os níveis de NAA, GPC+PC, PCr+Cr, mI e Glx de portadores de TAB e controles saudáveis.

4 HIPÓTESES

Os portadores de transtorno afetivo bipolar, em comparação com controles saudáveis, apresentam:

Hipótese 1: Níveis mais baixos de NAA.

Hipótese 2: Níveis mais altos de GPC+PC.

Hipótese 3: Níveis mais baixos de PCr+Cr.

Hipótese 4: Níveis mais altos de mL.

Hipótese 5: Níveis mais altos de Glx.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este projeto resulta de uma colaboração entre o Programa de Transtorno Bipolar (PROMAN), ligado ao Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) e o Centro de Transtornos do Humor do Departamento de Psiquiatria da Universidade de British Columbia (UBC), em Vancouver, British Columbia, Canadá. Ele foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas Clínicas da UBC e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado, após terem todos os procedimentos do estudo explicados pelo pesquisador.

Toda coleta de dados foi realizada pelo aluno e a equipe especializada da UBC em Vancouver e ela foi supervisionada pelo Dr. Lakshmi Yatham, principal investigador e coordenador da pesquisa. A análise estatística, a discussão dos resultados da pesquisa e a redação da tese foi realizada no PROMAN, sob orientação do Dr. Beny Lafer, após o retorno do autor ao Brasil. Durante sua estada no Canadá, o aluno pesquisador conduziu as entrevistas psiquiátricas e a aplicação das escalas nos pacientes que participaram da pesquisa. Acompanhou-os também durante a realização de seus exames de ERM, auxiliou a técnica de laboratório no uso do programa LC Model para obtenção das concentrações dos metabólitos cerebrais e na checagem da qualidade dos dados. Organizou o banco de dados, identificou as medidas válidas para o estudo, assim como processou a análise estatística. A redação do artigo científico ligado a esta tese foi realizada sob supervisão dos Drs. Beny Lafer e Lakshmi Yatham.

5.1 Casuística

Foram selecionados controles saudáveis, recrutados através de divulgação na comunidade, e pacientes provenientes de hospitais e serviços comunitários ligados ao Vancouver Hospital Health Sciences Center, em Vancouver, British Columbia, Canadá, o que incluiu a enfermaria e o ambulatório do Centro de Transtornos do Humor do Departamento de Psiquiatria da UBC.

Os portadores de TAB eram participantes do estudo STOP-EM (do inglês, *Systematic Treatment Optimization Program for Early Mania*), um estudo naturalístico iniciado em 2005 que pretende seguir os pacientes por 20 anos. Os critérios de inclusão do STOP-EM foram deliberadamente amplos para incluir toda a diversidade de pacientes encontrada na prática clínica. Eles foram inseridos em uso de qualquer medicação psicotrópica, com presença de comorbidades ou não. Podiam ter tido sintomas de mania pura ou mista durante o episódio, além de poderem estar psicóticos ou não durante essa fase.

A avaliação inicial incluiu os seguintes passos:

1. Avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, dados demográficos, história médica e psiquiátrica.
2. Pesquisa no prontuário do paciente com a finalidade de identificar informações relacionadas aos contatos médicos prévios e uso de medicações.
3. Diagnóstico, avaliação da presença de comorbidades, avaliação do estado clínico, da gravidade da doença e do funcionamento psicossocial através da aplicação de instrumentos psiquiátricos.

5.2 Critérios de inclusão para portadores de TAB

1. Idade entre 18 e 35 anos.
2. Diagnóstico de TAB tipo I, de acordo com os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico IV (DSM-IV) (APA, 2000).
3. Encontrarem-se até três meses do início de seu primeiro episódio de mania.
4. Clinicamente estáveis, o suficiente para participarem do exame de ressonância magnética e responder aos instrumentos de avaliação.

5.3 Critérios de inclusão para controles saudáveis

1. Idade entre 18 e 35 anos
2. Ausência na vida de qualquer diagnóstico psiquiátrico pelo DSM-IV (APA, 2000)
3. Ausência de história familiar de TAB

5.4 Critérios de exclusão para todos participantes

1. Presença de objetos metálicos no corpo e próximos a órgãos nobres e/ou de marca-passos cardíacos
2. Doenças clínicas com repercussão no SNC e doenças neurológicas (incluindo epilepsia, acidente vascular cerebral, trauma crânio-encefálico grave).

5.5 Instrumentos de avaliação psiquiátrica

As entrevistas foram conduzidas pelo aluno e por outros psiquiatras do serviço, todos treinados na utilização de instrumentos psiquiátricos de pesquisa. Os instrumentos de avaliação psiquiátrica utilizados foram:

- i. MINI-Entrevista Internacional de Neuropsiquiatria (MINI) (Sheehan et al., 1998). Ela consiste de uma entrevista estruturada curta para a realização de diagnósticos psiquiátricos de acordo com o DSM-IV (APA, 2000) e a Classificação Internacional de Doenças, décima edição (CID-10). A entrevista cobre 16 módulos que incluem as doenças psiquiátricas mais prevalentes. Foi utilizado em nossa amostra para o diagnóstico de TAB e para a avaliação da presença de comorbidades.
- ii. Escala de Depressão de Hamilton - 29 itens (HAMD) (Williams et al., 1988). Essa é a escala mais utilizada na literatura de psiquiatria para avaliar depressão. Ela tem demonstrado ser uma escala com boa confiabilidade, inclusive entre diferentes avaliadores. Além disso, existem estudos que demonstram sua validade ao ser comparada com avaliações clínicas e a escala *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale* (MADRS). Sua aplicação é relativamente breve, com uma média de duração de 15 minutos. Os itens da escala são pontuados de 0 a 2 ou de 0 a 4, com uma pontuação total variando de 0 a 84 pontos para a HAMD-29. Pontuações totais de 7 ou menos costumam ser consideradas normais; entre 8 e 17 indicam depressão leve; entre 18 e 24 indicam depressão moderada e acima de 24, depressão grave. Foi utilizada para a avaliação e quantificação dos sintomas depressivos nos últimos sete dias antes do exame de ¹H-ERM.

- iii. Escala de Mania de Young (YMRS) (Young et al., 1978). Trata-se da escala mais utilizada na literatura psiquiátrica para avaliação de mania. Constitui-se de 11 perguntas que avaliam os diferentes sintomas que compõem a síndrome de mania. Todos os itens são graduados em 5 níveis de gravidade. Os itens são pontuados de 0 a 4, mas quatro itens recebem pontuação dobrada e variam de 0 a 8 pontos. O valor zero significa ausência do sintoma avaliado e o valor máximo (4 ou 8), a presença mais frequente e mais grave do sintoma. A pontuação da escala pode variar de 0 a 60 pontos. Foi utilizada para a avaliação de presença e a intensidade de sintomas maníacos nos últimos sete dias antes do exame de ¹H-ERM.
- iv. Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica (BPRS) (Overall; Gorham, 1962). Essa é uma escala para avaliar sintomas psiquiátricos em geral, mas principalmente os sintomas psicóticos. É composta por 18 itens, cada um podendo variar de 1 a 7 pontos. O escore mínimo é de 18 e o máximo de 126 pontos.
- v. Escala de Impressão Clínica Global – Gravidade (CGI) (Guy, 1976). Foi utilizada para avaliar a gravidade do quadro clínico atual. Essa escala deve ser aplicada por indivíduos com experiência clínica e é pontuada da seguinte forma de acordo com a avaliação clínica realizada: não está doente = 1, muito leve = 2, leve = 3, moderada = 4, acentuada = 5, grave = 6, extremamente grave = 7.
- vi. Avaliação Global do Funcionamento (AGF) (APA, 2000). É o instrumento utilizado para quantificar o Eixo V do DSM-IV. É realizada a avaliação do funcionamento psicológico, social e ocupacional do indivíduo, juntamente com a presença de sintomas psiquiátricos. A escala tem pontuação de 0 a

100, sendo que o escore de 100 representa o funcionamento normal com ausência de sintomas.

5.6 Aquisição de exame de ^1H -ERM

O estudo de ^1H -ERM foi conduzido em um aparelho de ressonância magnética Philips Achieva de 3 Tesla (T), localizado no Centro de Pesquisa em Ressonância Magnética da UBC, em um prédio anexo ao Centro de Transtornos do Humor, na UBC, em Vancouver, Canadá. A realização dos exames foi feita sob coordenação do Prof. Alex MacKay, diretor do serviço. De início, a cabeça do indivíduo foi posicionada e imobilizada e imagens de RMN T2-ponderadas foram obtidas nos planos sagital, coronal e axial para permitir o posicionamento do voxel para espectroscopia em ambos os hipocampus. Usando primeiramente a imagem sagital, em um corte que permitisse boa visualização do hipocampo, o voxel foi posicionado angulado com o eixo longo dessa estrutura. Em seguida, utilizando-se a imagem coronal, o voxel foi ajustado nas direções medial/lateral e superior/inferior para ficar centralizado no hipocampo, ajustando-se novamente o ângulo no plano sagital, caso fosse necessário. Buscou-se evitar a presença de líquido céfalorraquidiano (LCR) no interior do voxel (figura 4).

Figura 4 - Localização do voxel no hipocampo em cortes sagital, axial e coronal

NOTA: Apesar da figura mostrar apenas o voxel do hemisfério esquerdo, foram examinados ambos os hipocampus no estudo.

O tamanho do voxel foi de 30 x 15 x 15 mm (6,75 cm³ ou ml). A ¹H-ERM de voxel único foi conduzida utilizando a sequência PRESS com tempo de eco (TE) = 35 milissegundos e tempo de repetição (TR) = 2,0 segundos, após a realização da homogeneização automática do campo magnético. A largura de banda foi de 2000 Hertz. Os sinais dos metabólitos foram normalizados pelo espectro não-suprimido da água para a quantificação absoluta dos metabólitos.

5.7 Processamento da ¹H-ERM

O espectro foi processado e analisado utilizando-se o programa Linear Combination Model (LC Model) (Provencher, 1993), que é capaz de ajustar automaticamente as áreas sob cada pico, independente do operador. Os níveis de NAA, GPC+PC, mI, PCr+Cr e Glx foram medidos em pacientes e controles. Somente os metabólitos com um nível razoável de confiança de adequação, isto é, os metabólitos com um valor médio global de Cramer-Rao Lower Bound (CRLB) menor que 20% foram incluídos na análise (Kreis et al., 2004). Essa medida é fornecida pelo programa juntamente com os níveis dos metabólitos.

5.8 Medidas volumétricas do hipocampo

Mediu-se o volume do hipocampo, utilizando-se uma coleção de programas para analisar imagens cerebrais funcionais e estruturais, a qual foi desenvolvida pelo Centro de Imagem por Ressonância Magnética e Ressonância Magnética Funcional do Cérebro de Oxford (FMRIB). Os programas estão agrupados em uma biblioteca virtual chamada de FMRIB Software Library (FSL). O programa de computador FSL-Brain Extraction

Tool (BET) foi utilizado para remover todos os sinais não cerebrais dos dados brutos. Através de outro programa, o FMRIB's Automated Segmentation Tool (FAST) 4, foi possível retirar o tecido ósseo e segmentar a imagem em substância cinzenta, substância branca e LCR. As bordas do hipocampo foram determinadas utilizando-se mapas do Instituto Neurológico de Montreal (figura 5).

Figura 5 - Delimitação do hipocampo para mensuração do volume

A delimitação do hipocampo foi realizada utilizando-se os programas FSL e mapas do Instituto Neurológico de Montreal

5.9 Análise estatística

Realizou-se a análise estatística, utilizando o SPSS (do inglês, Statistical Package for Social Sciences) versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Inicialmente, verificaram-se os pressupostos de normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. A seguir, o teste de qui-quadrado para variáveis categóricas ou o teste t para variáveis contínuas foram usados para comparar os grupos de pacientes e controles saudáveis com respeito às variáveis demográficas. Os níveis dos metabólitos foram comparados entre os grupos de pacientes e controles utilizando-se o teste de

análise de covariância (ANCOVA). Idade e volume de substância cinzenta do hipocampo foram utilizados como covariáveis. Em uma análise *post hoc*, subgrupos de pacientes (eutímicos e depressivos, com e sem abuso ou dependência de álcool e drogas, usuários de lítio ou divalproato) foram comparados entre si utilizando-se a ANCOVA, com idade e volume de substância cinzenta do hipocampo como covariáveis. Os subgrupos foram comparados previamente quanto à idade, sexo e variáveis clínicas para identificar se continuavam pareados quanto a estes parâmetros ou se seria necessário adicionar alguma covariável ao modelo de ANCOVA. Testes de correlações bivariadas de Pearson foram utilizados para investigar as associações entre os metabólitos cerebrais e as variáveis demográficas contínuas em pacientes e controles e com as variáveis clínicas contínuas no grupo de pacientes. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Em razão de seu caráter exploratório, nas análises *post hoc* não se utilizou a correção de Bonferroni para múltiplas comparações.

6 RESULTADOS

Na tabela 3, apresentam-se as características demográficas da amostra de pacientes e controles saudáveis. Incluem-se cinquenta e oito pacientes (28 do sexo masculino e 30 do sexo feminino) foram incluídos (tabela 3). A idade média da amostra foi de 22,7 anos, variando de 16 a 34 anos de idade. Os pacientes tinham bom nível educacional, com uma média de 14 anos de escolaridade. A grande maioria dos pacientes era solteira (91,4%) e de etnia caucasiana (81%). As características clínicas dos pacientes (tabela 4) mostraram uma duração média da doença de 2,7 anos (desvio padrão (DP) 4,2) do primeiro episódio de humor à entrada no estudo (incluindo episódios de depressão e hipomania que pudessem ter ocorrido antes do primeiro episódio maníaco). A idade de início média da doença foi de 19,9 anos (DP 4,2). Oitenta e oito por cento dos pacientes (n = 51) foram hospitalizados no primeiro episódio de mania e 12% (n = 7) receberam apenas tratamento ambulatorial. A duração média do episódio maníaco foi de 59,7 dias (DP 49). Cinquenta e um por cento dos pacientes apresentaram no mínimo um episódio de depressão (41%) ou hipomania (10%) antes de seu primeiro episódio de mania. O número médio de episódios antes do episódio de mania foi de 1,2 (DP 1,6) para a depressão e 0,5 (DP 1,6) para hipomania. Sintomas psicóticos estavam presentes durante o episódio maníaco em 72,4% dos pacientes, mas apenas 13,8% apresentavam sintomas psicóticos na data do exame de ¹H-ERM. Comorbidade atual com abuso ou dependência de substâncias (tabela 5) estava presente em 29,3% dos pacientes para maconha, 8,6% para outras drogas (isto é, cocaína, ecstasy e outras) e 10,3% para o álcool. No total da amostra, 40% dos pacientes apresentavam comorbidade com abuso ou dependência de uma substância psicoativa (alguns pacientes apresentavam abuso ou dependência de mais de uma substância). Os

transtornos de ansiedade estavam presentes, como comorbidades, em 6,9% dos pacientes. Dez por cento dos pacientes relataram uma tentativa de suicídio no passado. Os pacientes apresentavam diferentes estados de humor no momento do exame: 63,8% (n = 37) estavam eutímicos, 27,6% (n = 16) estavam deprimidos, 1,7% (n = 1) apresentavam hipomania e 6,9% (n = 4) estavam em estado misto. No momento da entrada no estudo, 87,9% dos pacientes estavam usando um estabilizador do humor (n = 51). Desses pacientes, 45% usavam lítio, 53% faziam uso de divalproato de sódio e 2% estavam usando ambos. Antipsicóticos atípicos estavam sendo usados por 79,3% dos pacientes, enquanto 5,2% estavam usando antidepressivos e 8,6% usavam benzodiazepínicos. Sete por cento dos pacientes não faziam uso de medicamentos no momento do exame (tabela 6).

Tabela 3 - Características demográficas dos grupos de pacientes e controles

Características	Pacientes (n = 58)	Controles (n = 27)	Valor p
Idade, em anos (média ± DP)	22,7 ± 4,4	22,6 ± 4,6	0,891
Educação, em anos (média ± DP)	14,0 ± 2,2	14,8 ± 2,7	0,164
Gênero: homens, n (%)	28 (48,3)	13 (48,1)	0,991
Estado Civil, n (%)			
Solteiro	53 (91,4)	26 (96,3)	0,588
Casado	3 (5,2)	1 (3,7)	
Separado	2 (3,4)	-	
Etnia, n (%)			
Caucasianos	47 (81,0)	19 (70,4)	0,513
Asiáticos	9 (15,5)	7 (25,9)	
Outros	2 (3,4)	1 (3,7)	
Destros, n (%)	52 (89,7)	26 (96,3)	0,423

Tabela 4 - Características clínicas dos pacientes com transtorno afetivo bipolar

Características	Pacientes (n = 58)
Duração da doença, anos (média ± DP)	2,7 (4,2)
Idade de início da doença, anos (média ± DP)	19,9 (4,2)
Duração da mania, dias (média ± DP)	59,7 (49)
Local de tratamento do primeiro episódio maníaco, n (%)	
Hospital	51 (88)
Ambulatório	7 (12)
Presença de psicose durante o episódio de mania, n (%)	41 (72,4)
Presença de psicose no momento do exame, n (%)	8 (13,8)
Primeiro episódio de humor na vida, n (%)	
Mania	28 (48,3)
Depressão	24 (41,4)
Hipomania	6 (10,3)
Estado do humor no momento do exame, n (%)	
Eutímia	37 (63,8)
Depressão	16 (27,6)
Mania	0 (0,0)
Hipomania	1 (1,7)
Misto	4 (6,9)

Tabela 5 - Comorbidade com abuso e dependência de substâncias na amostra de pacientes bipolares

Comorbidade	Pacientes (n = 58)
Abuso ou dependência de maconha, n (%)	17 (29,3)
Abuso ou dependência de outras drogas, n (%)	5 (8,6)
Abuso ou dependência de álcool, n (%)	6 (10,3)
Abuso dependência de álcool/drogas (total), n (%)	23 (40)
Transtornos de ansiedade, n (%)	4 (6,9)

Tabela 6 - Medicações utilizadas pelos pacientes com transtorno afetivo bipolar

Medicações	Pacientes (n = 58)
Estabilizadores do humor, n (%)	51 (87,9)
Lítio, n (%)	23 (45)
Divalproato de Sódio, n (%)	27 (53)
Lítio + Divalproato de Sódio, n (%)	1 (2)
Antipsicóticos atípicos, n (%)	46 (79,3)
Antidepressivos, n (%)	3 (5,2)
Ansiolíticos, n (%)	5 (8,6)
Sem medicação, n (%)	4 (6,9)

Tabela 7 - Avaliações clínicas utilizando escalas

Escalas	Pacientes (n = 58)
Escala de Mania de Young (média ± DP)	3,47 ± 5,7
Escala de Depressão de Hamilton (média ± DP)	6,53 ± 8,6
Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica, (média ± DP)	22,25 ± 5,4
Escala de Avaliação Global do Funcionamento (AGF), (média ± DP)	67,55 ± 13,6
Escala de Impressão Clínica Global (ICG), (média ± DP)	2,12 ± 1,3

Os resultados médios das escalas de sintomas clínicos foram: Escala de Mania de Young = 3,47 pontos (DP = 5,7) (0 a 28 pontos); Escala de Depressão de Hamilton = 6,53 pontos (DP = 8,6) (0 a 30), Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica = 22,25 (DP = 5,4) (18 a 47); Escala de Avaliação Global do Funcionamento = 67,5 (DP = 13,6) (30 a 95), Escala de Impressão Clínica Global = 2,12 (DP = 1,3) (1 a 5) (Tabela 7).

6.1 Segmentação do voxel

Foram medidos os volumes de substância cinzenta, de substância branca e de LCR no voxel em pacientes e controles. O volume (V) de substância cinzenta no voxel foi significativamente menor em pacientes no hipocampo esquerdo (pacientes: $V = 2150 \text{ mm}^3$ (DP 222); indivíduos saudáveis: $V = 2283 \text{ mm}^3$ (DP 253), $p = 0,016$) e hipocampo direito (pacientes: $V = 2139 \text{ mm}^3$ (DP 240); indivíduos saudáveis: $V = 2253 \text{ mm}^3$ (DP 229), $p = 0,043$). Não houve diferenças quanto às medidas de substância branca e quantidade de líquido cefalorraquidiano entre os grupos, em ambos os hipocampos (Tabela 8).

Tabela 8 - Segmentação do voxel em pacientes com transtorno afetivo bipolar e controles em ambos os hemisférios

Volume (mm³)	Pacientes (n = 58)	Controles (n = 27)	Valor p
Subst. cinzenta HE (média ± DP)	2150 ± 222	2283 ± 253	0,016*
Subst. cinzenta HD (média ± DP)	2139 ± 240	2253 ± 229	0,043*
Subst. branca HE (média ± DP)	214 ± 54	213 ± 64	0,911
Subst. branca HD (média ± DP)	263 ± 88	264 ± 85	0,925
LCR HE (média ± DP)	234 ± 123	219 ± 81	0,569
LCR HD (média ± DP)	205 ± 111	182 ± 68	0,327

Subst. = substância, HE = hipocampo esquerdo, HD = hipocampo direito, LCR = líquido cefalorraquidiano

* $p < 0,05$

6.2 Medidas de qualidade da ^1H -ERM

Na tabela 9, apresentamos a porcentagem de medidas que apresentaram CRLB < 20%. Como podemos observar, os valores foram bastante razoáveis para todos os grupos, dado que os metabólitos com CRLB abaixo de 20% estiveram entre 88 e 100% das medidas. A única exceção foram as medidas de Glx, que apresentaram CRLB < 20% entre 67.2 e 77.8% das medidas. Isso se deve à baixa resolução principalmente da medida de glutamina. Essa perda da acurácia deve ser considerada ao avaliarmos os resultados de Glx em ambos os grupos. Outras medidas de qualidade do espectro foram realizadas, como a razão sinal/ruído (RSR) e a FWHM, do inglês *full width at half maximum*. Tais medidas são importantes para garantir que os espectros não apresentem artefatos que possam produzir resultados falsos. A RSR é obtida dividindo-se a altura do metabólito com pico mais largo pela amplitude do ruído de base e o valor da FWHM é obtido medindo-se a largura do maior pico na metade da sua altura. Segundo Kreis (2004), devem ser rejeitadas, por apresentarem má qualidade, as medidas com RSR < 3 e FWHM > 0,1. Em nosso estudo, essas medidas apresentaram valores dentro dos limites aceitáveis e não houve diferenças entre pacientes e controles. Essas medidas encontram-se na tabela 10, juntamente com a média dos valores de CRLB para cada metabólito, em ambos os grupos.

Tabela 9 - Porcentagem de medidas válidas para cada metabólito em pacientes e controles nos hemisférios direito e esquerdo

Medidas	Pacientes (n = 58)	Controles (n = 27)
Pacientes com medidas válidas de NAA, n (%)		
Esquerdo	57 (98,3)	26 (96,3)
Direito	58 (100)	27 (100)
Pacientes com medidas válidas de GPC+PC, n (%)		
Esquerdo	58 (100)	26 (96,3)
Direito	58 (100)	27 (100)
Pacientes com medidas válidas de mI, n (%)		
Esquerdo	56 (96,6)	23 (85,2)
Direito	51 (87,9)	25 (92,6)
Pacientes com medidas válidas de PCr+Cr, n (%)		
Esquerdo	58 (100)	26 (96,3)
Direito	57 (98,3)	27 (100)
Pacientes com medidas válidas de Glx, n (%)		
Esquerdo	44 (75,9)	21 (77,8)
Direito	39 (67,2)	19 (70,4)

NAA = N-acetil aspartato, GPC+PC = compostos de colina, mI = mio-inositol, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, Glx = glutamato + glutamina

Tabela 10 - Medidas de qualidade dos dados da espectroscopia por ressonância magnética de próton em pacientes bipolares e controles

Medidas	Pacientes (n = 58)	Controles (n = 27)	Valor p
Razão sinal/ruído (média ± DP)			
Hipocampo E	9,5 ± 2,8	9,5 ± 2,8	0,958
Hipocampo D	7,9 ± 1,9	7,7 ± 2,5	0,694
FWHM (média ± DP)			
Hipocampo E	0,057 ± 0,014	0,052 ± 0,010	0,104
Hipocampo D	0,062 ± 0,018	0,051 ± 0,012	0,009*
Valor de CRLB (média ± DP)			
NAA (média ± DP)			
Esquerdo	7,44 ± 2,5	7,19 ± 2,8	0,692
Direito	8,05 ± 3,6	8,74 ± 3,0	0,393
GPC+PC (média ± DP)			
Esquerdo	5,79 ± 1,9	5,77 ± 1,7	0,957
Direito	6,79 ± 2,3	7,11 ± 2,1	0,552
mI (média ± DP)			
Esquerdo	10,21 ± 3,9	8,61 ± 2,3	0,026*
Direito	9,84 ± 2,7	9,68 ± 2,9	0,812
PCr+Cr (média ± DP)			
Esquerdo	5,97 ± 2,4	6,12 ± 1,9	0,780
Direito	6,75 ± 2,3	7,04 ± 2,4	0,605
Glx (média ± DP)			
Esquerdo	13,3 ± 3,9	13,0 ± 3,7	0,776
Direito	13,5 ± 3,0	14,7 ± 3,7	0,195

FWMH = full-width-half-maximum, CRLB = Crámer-Rao Lower Bound, NAA = N-acetil aspartato, GPC+PC = compostos de colina, mI = mio-inositol, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, Glx = glutamato + glutamina, E = esquerdo, D = direito

6.3 Medidas de metabólitos entre os grupos

Não houve diferenças significativas entre pacientes e indivíduos saudáveis com relação à idade, sexo e anos de escolaridade. Não foram encontradas diferenças de volume de substância branca. Em ambos os grupos, todas as medidas de metabólitos apresentaram distribuição normal. Os níveis dos metabólitos (NAA, GPC+PC, PCr+Cr, mI e Glx) foram comparados entre os grupos, utilizando volume de substância cinzenta e idade como covariáveis e não foram encontradas diferenças entre eles no hipocampo esquerdo ou direito (tabela 11; gráficos 1 e 2).

Tabela 11 - Níveis dos metabólitos no hipocampo de pacientes com transtorno afetivo bipolar e controles saudáveis

Metabólitos (mmol/kg)	Pacientes (n = 58)	Controles (n = 27)	Valor p
NAA (média ± DP)			
Esquerdo	5,59 ± 0,78	5,51 ± 0,66	0,589
Direito	5,69 ± 0,80	5,60 ± 0,93	0,629
GPC+PC (média ± DP)			
Esquerdo	1,83 ± 0,28	1,79 ± 0,27	0,475
Direito	1,86 ± 0,33	1,79 ± 0,31	0,332
mI (média ± DP)			
Esquerdo	5,36 ± 1,6	5,77 ± 1,3	0,305
Direito	6,10 ± 2,0	6,5 ± 1,36	0,390
PCr+Cr (média ± DP)			
Esquerdo	5,13 ± 0,76	5,01 ± 0,71	0,422
Direito	5,24 ± 0,91	5,25 ± 0,86	0,988
Glx (média ± DP)			
Esquerdo	11,64 ± 2,98	12,61 ± 3,0	0,216
Direito	12,73 ± 3,74	11,9 ± 3,55	0,539

NAA = N-acetil aspartato, GPC+PC = compostos de colina, mI = mio-inositol, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, Glx = glutamato + glutamina

Gráfico 1 - Níveis dos metabólitos no hipocampo direito de pacientes e controles

NAA = N-Acetyl-Aspartato, GPC+PC = Compostos de Colina, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, ml = Mio-Inositol, Glx = Glutamato + Glutamina

Mmol/kg = milimol por kilo

NAA: $F(1,81) = 0,2$, $p = 0,629$

GPC+PC: $F(1,81) = 0,9$, $p = 0,332$

PC+PCr: $F(1,80) = 0,0$, $p = 0,988$

ml: $F(1,72) = 0,7$, $p = 0,390$

Glx: $F(1,54) = 0,4$, $p = 0,539$

Gráfico 2 - Níveis dos metabólitos no hipocampo esquerdo de pacientes e controles

NAA = N-Acetyl-Aspartato, GPC+PC = Compostos de Colina, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, ml = Mio-Inositol, Glx = Glutamato + Glutamina

Mmol/kg = milimol por kilo

NAA: $F(1,79) = 0,3$, $p = 0,589$

GPC+PC: $F(1,80) = 0,5$, $p = 0,475$

PC+PCr: $F(1,80) = 0,6$, $p = 0,422$

ml: $F(1,75) = 1,1$, $p = 0,305$

Glx: $F(1,61) = 1,6$, $p = 0,216$

6.4 Análise exploratória da associação dos metabólitos com variáveis clínicas

Para avaliar se a diferença no estado de humor pode afetar os níveis de metabólitos, os pacientes com depressão foram comparados aos pacientes eutímicos. Pacientes em hipomania ou estados mistos foram excluídos devido a seu pequeno número em toda a amostra ($n = 1$ para hipomania e $n = 4$ para o estado misto). Grupos de pacientes com depressão ($n = 16$) e pacientes eutímicos ($n = 37$) não foram estatisticamente diferentes em relação à idade (deprimidos: 23,7 [DP 4]; eutímicos: 22,1 [DP 4,8], $p = 0,245$), à idade de início da doença (deprimidos: 18,2 [DP 5,4]; eutímicos: 20,8 [DP 5,0], $p = 0,088$), sexo (deprimidos: 37,5% do sexo masculino; eutímicos: 54,1% do sexo masculino, $p = 0,268$); volume de substância cinzenta à esquerda (deprimidos: 2597 [DP 441]; eutímicos: 2726 [DP 405], $p = 0,306$); volume de substância cinzenta à direita (deprimidos: 3743 [DP 447]; eutímicos: 3648 [DP 413], $p = 0,460$). Os grupos foram diferentes em termos de duração da doença (deprimidos: 5,4 [DP 6,2]; eutímicos: 1,2 [DP 2,1], $p = 0,016$) e esta característica clínica foi utilizada como covariável na análise, além das variáveis utilizadas na comparação entre pacientes e controles (idade e volume de substância cinzenta). Nenhuma diferença nos níveis de metabólitos foi encontrada entre os subgrupos no hipocampo esquerdo e direito (tabela 12).

Tabela 12 - Concentrações absolutas dos metabólitos em pacientes com depressão e eutímicos nos hipocampus esquerdo e direito

Metabólitos (mmol/kg)	Pacientes com depressão (n = 16)	Pacientes eutímicos (n = 37)	Valor p
NAA (média ± DP)			
Esquerdo	5,91 ± 0,73	5,49 ± 0,79	0,066
Direito	5,78 ± 0,82	5,70 ± 0,81	0,843
GPC+PC (média ± DP)			
Esquerdo	1,86 ± 0,26	1,82 ± 0,30	0,873
Direito	1,82 ± 0,37	1,87 ± 0,31	0,904
PCr+Cr (média ± DP)			
Esquerdo	5,25 ± 0,61	5,13 ± 0,79	0,734
Direito	5,15 ± 0,73	5,28 ± 0,96	0,955
mI (média ± DP)			
Esquerdo	5,50 ± 2,07	5,45 ± 1,50	0,780
Direito	6,37 ± 2,26	5,81 ± 1,98	0,816
Glx (média ± DP)			
Esquerdo	11,34 ± 2,38	11,81 ± 3,24	0,598
Direito	14,31 ± 5,59	12,14 ± 2,45	0,425

NAA = N-acetil aspartato, GPC+PC = compostos de colina, mI = mio-inositol, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, Glx = glutamato + glutamina

O efeito de abuso ou dependência de drogas foi avaliado dividindo os doentes em dois grupos, com ($n = 23$) e sem ($n = 34$) diagnóstico comórbido de abuso ou dependência de drogas ou álcool. Grupos eram comparáveis em idade (abuso/dependência: 22,6 [DP 3,9]; sem abuso/dependência: 23,0 [DP 4,8], $p = 0,728$), idade de início da doença (abuso/dependência: 20,4 [DP 5,4]; sem abuso/dependência: 19,8 [DP 5,0], $p = 0,658$), duração da doença (abuso/dependência: 2,0 [DP 3,4]; sem abuso/dependência: 3,2 [DP 4,6], $p = 0,288$), sexo (abuso/dependência: 52,2% do sexo masculino; sem abuso/dependência: masculino 44,1%, $p = 0,550$); volume de substância cinzenta à esquerda (abuso/dependência: 2758 [DP 381]; sem abuso/dependência: 2672 [DP 415], $p = 0,430$); volume de substância cinzenta à direita (abuso/dependência: 3615 [DP 357]; sem abuso/dependência: 3709 [DP 453], $p = 0,407$). Não houve diferença entre os grupos quanto aos níveis de NAA, GPC+PC, Glx e PCr+Cr nos hipocampus esquerdo e direito (tabela 13). Os níveis de mI foram menores em pacientes com abuso/dependência de substâncias no hipocampo direito (abuso/dependência de 5,28 [DP 1,18]; nenhum abuso/dependência: 6,64 [DP 2,3], $p = 0,010$), mas não no hipocampo esquerdo. A comparação entre os pacientes sem abuso ou dependência de drogas/álcool ($n = 34$) e controles saudáveis ($n = 27$) não mostrou qualquer diferença nos níveis de mI no hipocampo direito (sem dependência/abuso: 6,64 [DP 2,3]; controles saudáveis: 6,48 [DP 1,4], $p = 0,767$). Todavia, a comparação entre pacientes com abuso/dependência de drogas ou álcool ($n = 23$) e indivíduos saudáveis ($n = 27$) mostrou níveis mais baixos de mI no hipocampo direito (com dependência/abuso: 5,28 [DP 1,2]; controles saudáveis: 6,48 [DP 1,4], $p = 0,004$).

Tabela 13 - Concentrações absolutas dos metabólitos em pacientes com e sem abuso / dependência de álcool e drogas nos hipocampus E e D

Metabólitos (mmol/kg)	Pacientes com abuso/dependência (n = 23)	Pacientes sem abuso/dependência (n = 34)	Valor p
NAA (média ± DP)			
Esquerdo	5,67 ± 0,87	5,50 ± 0,70	0,436
Direito	5,65 ± 0,88	5,71 ± 0,76	0,781
GPC+PC (média ± DP)			
Esquerdo	1,84 ± 0,28	1,82 ± 0,30	0,796
Direito	1,84 ± 0,25	1,86 ± 0,38	0,835
PCr+Cr (média ± DP)			
Esquerdo	5,24 ± 0,86	5,03 ± 0,70	0,324
Direito	5,30 ± 0,52	5,21 ± 1,13	0,714
mI (média ± DP)			
Esquerdo	5,54 ± 1,85	5,23 ± 1,51	0,488
Direito	5,28 ± 1,18	6,64 ± 2,35	0,022*
Glx (média ± DP)			
Esquerdo	11,46 ± 2,87	11,75 ± 3,18	0,755
Direito	12,31 ± 2,38	13,28 ± 4,93	0,439

NAA = N-acetil aspartato, GPC+PC = compostos de colina, mI = mio-inositol, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, Glx = glutamato + glutamina

*p < 0,05

Investigou-se o efeito do uso das medicações, dividindo os pacientes em usuários de lítio ($n = 23$) ou divalproato de sódio ($n = 27$). Um paciente usando os dois estabilizadores de humor foi excluído da análise. Os grupos não foram estatisticamente diferentes quanto à idade (lítio: 22,5 [DP 4,4]; divalproato: 22,8 [DP 4,7], $p = 0,802$), a idade de início da doença (lítio: 19,9 [DP 4,9]; divalproato: 20,0 [DP 5,7], $p = 0,935$), duração da doença (lítio: 2,5 [DP 4,4]; divalproato: 2,8 [DP 3,9], $p = 0,799$), sexo (lítio: 52,2% do sexo masculino; divalproato: 37% do sexo masculino; $p = 0,283$); volume de substância cinzenta à esquerda (lítio: 3815 [DP 341]; divalproato: 3798 [DP 383], $p = 0,865$); volume de substância cinzenta à direita (lítio: 3584 [DP 390]; divalproato: 3793 [DP 410], $p = 0,074$), porcentagem de pacientes que tomam antipsicóticos atípicos (lítio: 82,6%; divalproato: 85,2%, $p = 0,804$). Nenhuma diferença nos níveis de NAA, GPC+PC, mI e Glx foi detectada entre os grupos no hipocampo esquerdo e direito. Os níveis de PCr+Cr foram mais elevados em pacientes em uso de lítio no hipocampo direito quando comparados com pacientes utilizando valproato (lítio: 5,62 [DP 1,1]; divalproato: 5,05 [DP 0,6], $p = 0,028$), mas não no hipocampo esquerdo (tabela 14). A comparação entre ambos os subgrupos de pacientes e os controles saudáveis não mostrou qualquer diferença nos níveis de PCr+Cr no hipocampo direito e esquerdo.

Tabela 14 - Concentrações absolutas dos metabólitos em pacientes em uso de valproato ou lítio nos hipocampos E e D

Metabólitos (mmol/kg)	Divalproato de sódio (n = 27)	Carbonato de lítio (n = 23)	Valor p
NAA (média ± DP)			
Esquerdo	5,47 ± 0,77	5,60 ± 0,67	0,549
Direito	5,72 ± 0,76	5,66 ± 0,86	0,795
GPC+PC (média ± DP)			
Esquerdo	1,78 ± 0,29	1,91 ± 0,28	0,119
Direito	1,81 ± 0,25	1,93 ± 0,37	0,185
PCr+Cr (média ± DP)			
Esquerdo	4,96 ± 0,86	5,25 ± 0,63	0,181
Direito	5,05 ± 0,61	5,61 ± 1,11	0,028*
mI (média ± DP)			
Esquerdo	5,07 ± 1,67	5,60 ± 1,77	0,292
Direito	5,95 ± 2,28	5,93 ± 1,48	0,978
Glx (média ± DP)			
Esquerdo	11,96 ± 3,19	11,23 ± 2,80	0,459
Direito	12,45 ± 2,38	11,58 ± 2,00	0,256

NAA = N-acetil aspartato, GPC+PC = compostos de colina, mI = mio-inositol, PCr+Cr = Fosfocreatina + Creatina, Glx = glutamato + glutamina

*p < 0,05

A investigação de correlações de níveis de metabólitos com variáveis demográficas, clínicas e de segmentação do voxel mostrou que a idade está associada com GPC+PC ($r = -0,476$, $p = 0,014$), PCr+Cr ($r = -0,403$, $p = 0,041$) e Glx ($r = 0,480$, $p = 0,028$) no hipocampo esquerdo e com mI ($r = 0,432$, $p = 0,031$) no hipocampo direito dos indivíduos saudáveis. Não houve correlação entre idade e níveis de metabólitos em pacientes bipolares. Volume de substância cinzenta do hipocampo esquerdo está associado com NAA ($r = 0,267$, $p = 0,044$) e GPC+PC ($r = 0,285$, $p = 0,030$) em pacientes e com GPC+PC ($r = 0,486$, $p = 0,012$) e PCr+Cr ($r = 0,528$, $p = 0,006$) em indivíduos saudáveis. Não houve correlação entre níveis de metabólitos e volume de substância cinzenta no hipocampo direito. Níveis de metabólitos não foram significativamente associados com a idade de início da doença, a idade de início do episódio maníaco, duração do primeiro episódio maníaco, o volume de matéria cinzenta à direita, o número de episódios depressivos anteriores e dose de lítio. Não foram encontradas associações entre todos os metabólitos e sintomas de humor (HAMD, YMRS) e os resultados das escalas de funcionamento global (GAF) e gravidade clínica (CGI-S). Houve uma associação entre sintomas medidos pela BPRS com mI no hipocampo esquerdo (BPRS: $r = -0,277$, $p = 0,041$), mas não com os outros metabólitos. Para investigar o efeito de sintomas psicóticos, a comparação entre os grupos com ($n = 42$) e sem ($n = 16$) psicose durante o episódio de mania foi feita, mas não mostrou diferenças nos níveis de metabólitos.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com TAB e os indivíduos saudáveis para todos os metabólitos investigados após o primeiro episódio de mania. Investigações exploratórias adicionais não encontraram diferenças nas comparações entre subgrupos de pacientes eutímicos e depressivos. Os pacientes bipolares abusadores ou dependentes de álcool e drogas apresentaram níveis menores de mI quando comparados a não dependentes e os pacientes usuários de lítio apresentaram níveis maiores de PCr+Cr, quando comparados a pacientes em uso de divalproato de sódio. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a investigar NAA, GPC+PC, PCr+Cr, mI e Glx no hipocampo de pacientes bipolares logo após o primeiro episódio de mania.

7.1 Caracterização da casuística

Em nosso estudo, os pacientes e os controles não apresentaram características demográficas distintas que pudessem interferir no resultado da pesquisa. Existem estudos que encontraram associações entre idade e diferentes metabólitos (Winsberg et al., 2000; Olvera et al., 2007). Logo, o estudo de grupos com diferenças na idade média poderia influenciar indevidamente o resultado final. Nossos resultados também mostraram um efeito da idade sobre alguns metabólitos no grupo de controles (GPC+PC, PCr+Cr, Glx e mI). Dessa forma, mesmo na ausência de diferença de idade entre os grupos, optamos por usar a idade como covariável em nosso modelo ANCOVA de comparação entre os grupos, a fim de eliminar qualquer possível influência dessa variável. Também é importante notar que a distribuição dos gêneros nos dois grupos não

apresentou diferença estatisticamente significativa. A influência do gênero não costuma ser pesquisada em estudos de ERM. No entanto, segundo um estudo (Nery et al., 2010), também é um fator que pode influenciar os níveis dos metabólitos. Ainda quanto às variáveis demográficas, um estudo observou uma associação entre anos de educação e NAA (Scherk et al., 2009), o que aponta para a importância de termos grupos semelhantes também quanto a essa característica.

Nosso estudo comparou 58 pacientes com 27 controles. O número menor de controles, com uma razão pacientes/controles de praticamente 2/1, pode levantar dúvidas sobre se o número de controles é suficiente para manter um poder estatístico adequado. Sabemos que um grupo maior de controles seria preferível. A fim de determinar se a amostra tinha poder suficiente para detectar diferenças reais dos níveis de metabólitos entre os grupos, foi realizada uma análise do poder do estudo usando o tamanho de efeito médio, calculado a partir dos estudos anteriores. O tamanho de efeito médio (TEM) com base em cinco estudos anteriores (Bertolino et al., 2003; Deicken et al., 2003; Atmaca et al., 2006; Scherk et al., 2008; Atmaca et al., 2012), que encontraram níveis significativamente mais baixos de NAA no hipocampo em pacientes com TAB em relação aos controles foi: TEM = 1,08. Segundo nossa análise, a amostra mínima necessária para detectar este tamanho de efeito, com uma proporção de caso-controle de 2/1, seria de 23 pacientes e 12 controles, com valores de $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,80$. Como o nosso estudo teve 58 pacientes e 27 controles, constatou-se que nossa amostra tinha poder suficiente para detectar diferenças de níveis de metabólitos se tais diferenças existissem, o que torna improvável que tenhamos tido um resultado falso-negativo devido a baixo poder estatístico. Essa possibilidade também fica menos provável quando observamos a consistência de nossos resultados, que mostraram

ausência de diferença na grande maioria das comparações entre os subgrupos de pacientes.

Quanto às características clínicas da amostra, é importante ressaltar que, apesar de serem todos pacientes de primeiro episódio de mania, 51,7% deles haviam tido episódios anteriores de depressão ou hipomania. Levando-se em conta esses episódios prévios à mania, a média de anos de doença em nossa amostra de pacientes foi de 2,7 anos. Como sabemos, o diagnóstico de TAB tipo I não pode ser feito até que os pacientes tenham seu primeiro episódio de mania. A não inclusão de pacientes com episódios prévios de hipomania e depressão traria dificuldades adicionais à seleção da amostra e limitaria a generalização dos resultados, visto que uma significativa proporção de portadores de TAB inicia o quadro com um desses episódios. É importante esclarecer que a média de duração da doença de 2,7 anos é muito menor que a duração da doença na grande maioria dos estudos com pacientes bipolares, que costumam incluir pacientes em vários estágios da doença. Por tratar-se de doença que tem duração por toda a vida, podemos considerar que nossa amostra de pacientes está no início da doença. Mesmo porque, 48,3% da amostra havia começado a doença nos últimos três meses.

Ainda sobre a amostra de pacientes, nossos resultados indicam que a maioria deles teve um primeiro episódio de mania de moderado a grave, já que oitenta e oito por cento necessitaram de internação, 72,4% apresentaram sintomas psicóticos e a duração do episódio foi de dois meses em média. Não foi possível investigar a associação entre algumas medidas de gravidade do episódio e as medidas dos metabólitos, porque o exame de ^1H -ERM foi realizado após a melhora dos sintomas de mania dos pacientes.

7.2 Qualidade dos dados de ERM

Para garantir a acurácia das medidas de ERM, utilizamos em nossa análise apenas os valores de CRLB menores do que 20%, conforme amplamente aceito no meio e sugerido em estudos técnicos (Cavasilla et al., 2001; Kreis et al., 2004). Os valores de CRLB são estimativas dos desvios padrões de cada medida da ERM. CRLB igual a 20% indica que, se a medida pudesse ser realizada diversas vezes, a média das medidas teria um desvio padrão de 20% de seu valor, para baixo ou para cima.

Um aspecto a ser considerado é o fato do voxel, utilizado para medir a neuroquímica do hipocampo, não seguir exatamente o contorno dessa estrutura. Portanto, parte do tecido investigado consistiu de estruturas adjacentes ao hipocampo, tais como o córtex entorhinal e o subiculum, o que pode ser mais bem caracterizado como formação hipocampal. As limitações de resolução associadas à técnica de ERM impediram a utilização de um voxel menor, o que prejudicaria muito a razão sinal-ruído.

Outro fator importante é a segmentação dos volumes de substância cinzenta, substância branca e LCR nos voxels de ambos pacientes e controles. A presença de maior quantidade de um tecido específico em um dos grupos ou diferenças na quantidade de LCR poderia influenciar nos resultados dos níveis de metabólitos (McLean et al., 2000). Estudos com ^1H -ERM têm encontrado diferentes concentrações dos metabólitos ao se comparar as substâncias cinzenta e branca de pacientes com TAB (Cecil et al., 2002; Dager et al., 2004; Friedman et al., 2004). Em nosso estudo, os pacientes apresentaram valores menores de substância cinzenta quando comparados aos controles em ambos os hipocampos. Por esse motivo, decidimos controlar o efeito dessa variável sobre os níveis de metabólitos adicionando o volume de substância cinzenta

como co-variável no modelo ANCOVA de comparação entre os grupos de pacientes e controles.

7.3 Ausência de diferença nos níveis de metabólitos entre os grupos

7.3.1 Efeito da duração da doença e presença de múltiplos episódios

Nossos achados indicam que não existem alterações estatisticamente significativas dos metabólitos entre pacientes e controles após o primeiro episódio de mania. Consideramos que a condição de nossos pacientes serem de primeiro episódio e de terem poucos anos de doença em média é o fator principal que levou à ausência de diferença dos metabólitos entre os grupos. De acordo com essa hipótese, a presença de múltiplos episódios e maior duração da doença refletiria um estágio mais avançado do TAB, mais grave e com repercussões na neurobiologia e na neuroquímica cerebral.

Como vimos na introdução, a ausência de alteração do NAA sugere uma falta de danos à integridade dos neurônios e a ausência de comprometimento do metabolismo energético. É possível que esse dano ocorra apenas como consequência da progressão da doença. Nossa amostra foi composta de pacientes com idade média de 22,7 anos e duração da doença de 2,7 anos (DP 4,2) (no entanto, 48% dos pacientes não tinham mais do que três meses de doença) o que pode ter sido determinante para a ausência de diferenças na neuroquímica do hipocampo entre os grupos. Consistente com essa hipótese, há evidências na literatura sugerindo que a alteração dos níveis de NAA encontrada em outros estudos de ^1H -ERM com pacientes bipolares crônicos seja um efeito de duração da doença. Por exemplo, Deicken et al. (2003) encontraram uma associação negativa entre os níveis de NAA e anos de doença no hipocampo de

pacientes com TAB. Idêntica associação foi também observada no CPFDL de pacientes com TAB (Chang et al., 2003). Também é importante notar que alguns estudos que encontraram baixos níveis de NAA no hipocampo de pacientes com TAB estudaram amostras com maior duração média de doença, de 18,7 (Deicken et al., 2003) e 8,2 (Sherk et al., 2008) anos ou investigaram pacientes que tinham uma idade média maior que a de nosso estudo, de 40,1 anos (Bertolino et al., 2003). A exceção é o estudo de Atmaca et al. (2006), que encontrou redução de NAA no hipocampo de pacientes de primeiro episódio de mania. Porém, esses pacientes estavam em mania, o que difere dos pacientes da nossa amostra. Quanto à GPC+PC, é digno de nota que um estudo encontrou uma correlação positiva entre o número de episódios prévios da doença e os níveis de GPC+PC no CPFDL, sugerindo um efeito da cronicidade da doença também para esse metabólito (Brambilla et al., 2005). O estudo de Senaratne et al. (2009), que encontrou aumento de GPC+PC no hipocampo de pacientes com TAB, foi realizado em pacientes com muitos anos de doença (em média 29,8 anos), mas os autores não investigaram a correlação entre anos de doença e níveis de GPC+PC. Já o estudo de Iosifescu et al. (2009), que também obteve resultados de aumento da GPC+PC, não relatou a duração média da doença nos pacientes investigados, mas pela média de idade dos mesmos, de 40,7 anos, podemos supor que se tratavam de pacientes crônicos. Além disso, o estudo de Atmaca et al. (2006), realizado em pacientes bipolares de primeiro episódio de mania, não encontrou diferenças para GPC+PC entre pacientes e controles. Para os outros metabólitos, PCr+Cr, mI e Glx, não existem estudos que investigaram o efeito da duração da doença no hipocampo de pacientes com TAB.

Consistente com a hipótese de que alterações fisiopatológicas podem estar associadas à progressão da doença, diversos estudos de neuroimagem que compararam pacientes de primeiro episódio de mania (PEM) e pacientes com múltiplos episódios

(ME) encontraram diferenças entre esses grupos. No estudo de Strakowski et al. (2002) observou-se que os ventrículos laterais eram maiores em pacientes com ME quando comparados com pacientes de PEM e controles. Além disso, houve uma associação do tamanho dos ventrículos com o número de episódios prévios da doença. DelBello et al. (1999) compararam pacientes com ME e PEM e identificaram que a área V3 do cerebelo era significativamente menor em pacientes com ME.

Estudos clínicos e neuropsicológicos também têm evidenciado um agravamento da doença em pacientes com múltiplos episódios. Por exemplo, pacientes com ME apresentam uma recuperação mais lenta e com mais sintomas residuais após a remissão do que pacientes com PEM (Tohen et al., 2010). Na mesma linha, pacientes crônicos têm mais déficits cognitivos que pacientes de primeiro episódio. O estudo de López-Jaramillo et al. (2010) comparou pacientes com TAB que haviam tido 1, 2 ou 3 ou mais episódios de mania ao longo da vida. Eles mostraram que os déficits cognitivos eram maiores nos pacientes com mais episódios de mania, principalmente nas funções de memória episódica, velocidade psicomotora e funções executivas. Outros estudos já haviam demonstrado uma associação entre a duração do episódio de mania ou depressão e déficits de memória e funções executivas (van Gorp et al., 1998) e também, entre o curso mais grave da doença (mais hospitalizações, mais episódios) e memória, atenção e capacidade de realizar tarefas que exijam abstração (Denicoff et al., 1999). Também tem se encontrado diferenças em relação ao funcionamento psicossocial. Pacientes que tiveram múltiplos episódios têm maior prejuízo funcional quando comparados com pacientes de primeiro episódio (Rosa et al., 2012).

Evidências obtidas através de estudos bioquímicos também demonstram a presença de neuroprogressão quando são investigados pacientes em diferentes estágios da doença. Um estudo demonstrou que o BDNF, uma proteína que é essencial para a

sobrevivência dos neurônios, está diminuído em pacientes crônicos com TAB, mas não nos pacientes em fase inicial da doença (Kauer-Sant 'Anna et al., 2009). Além disso, alguns autores encontraram que as consequências tóxicas para o cérebro são cumulativas, ocorrendo de acordo com o número de episódios maníacos (Brambilla et al, 2005; Kapczinski e al, 2008). O estresse oxidativo, o aumento da inflamação e a apoptose podem estar associados a esses mecanismos de lesão celular progressiva, que ocorre à medida que a doença evolui (Machado-Vieira et al., 2007; Gigante et al., 2011).

Apesar das evidências a favor da neuroprogressão, estudos têm demonstrado que algumas alterações já estão presentes no primeiro episódio da doença, e não seriam decorrentes do efeito causado pela duração da doença ou pela presença de múltiplos episódios. Os estudos que comparam pacientes em PEM e controles têm identificado alterações de volume e neurocognitivas nesses pacientes com TAB. Por exemplo, Strakowski et al. (1993) encontraram volumes maiores de terceiro ventrículo e do ventrículo lateral em pacientes com TAB no PEM quando comparados com controles e Kasai et al. (2003) encontraram menores volumes de substância cinzenta no polo temporal esquerdo de pacientes com TAB. Uma meta-análise recente, que analisou 45 estudos, identificou diversas alterações volumétricas em pacientes com TAB já no início da doença, tais como menor volume intracraniano, do cérebro total, e o volume total de substância cinzenta e branca, além de maiores volumes dos ventrículos laterais (De Peri et al., 2012).

Além disso, algumas alterações estão presentes em populações sem a doença, mas com alto risco de desenvolver o TAB. Em estudos com gêmeos monozigóticos afetados e não afetados pelo TAB, observou-se que os não afetados também apresentavam um aumento do caudado à esquerda (Noga et al., 2001) e diminuição do

volume de substância branca do hemisfério esquerdo (Kieseppa et al., 2003). Familiares de pacientes com TAB, mas sem a doença, também apresentam hiperintensidades de substância branca (Ahearn et al., 1998; Gunde et al., 2011) e, quando comparados a controles, observou-se redução da substância cinzenta no tálamo anterior (McIntosh et al., 2004) e aumento do giro frontal inferior à direita (Hajek et al., 2013). Outro estudo encontrou aumento de volume de substância cinzenta no giro parahipocampal em filhos de pacientes com TAB, não afetados pela doença (Ladouceur et al., 2008). Parentes de primeiro grau de portadores de TAB apresentam volumes de substância cinzenta menores na região da ínsula anterior à esquerda e menores volumes de substância branca no lobo frontal medial à direita (Matsuo et al., 2012). Observamos que, apesar desses estudos mostrarem alterações em populações de alto risco, eles não são consistentes quanto ao local e ao tipo de alteração encontrados. Por outro lado, há estudos que não encontraram diferenças volumétricas cerebrais entre populações de alto risco e controles no cíngulo (Hajek et al., 2008) e no hipocampo (McDonald et al., 2006; Hajek et al., 2009). Quanto à química cerebral, há dois estudos que utilizaram a ¹H-ERM e não encontraram diferenças nos níveis de metabólitos entre indivíduos com alto risco de desenvolver o TAB e controles saudáveis no CPFDL (Gallelli et al., 2005) e no córtex prefrontal medial e dorsal (Hajek et al., 2008). Mais estudos são necessários para que se possa identificar de forma mais precisa a natureza e as diferenças entre as alterações encontradas no início da doença ou em populações de risco e àquelas associadas à progressão da doença. É provável que anormalidades cerebrais encontradas em pacientes com TAB sejam causadas por mecanismos diferentes (fatores de risco primário, progressão da doença ou efeito de medicamentos), tornando o campo bastante complexo, o que ressalta a importância da realização de estudos com amostras

homogêneas de pacientes. O fato de não haver estudos de ^1H -ERM que encontraram alterações em populações de alto risco é compatível com os resultados de nosso estudo.

Os estudos de ^1H -ERM realizados em crianças e adolescentes têm demonstrado a presença de diversas alterações, conforme os dados apresentados na introdução. No entanto, não há estudos do hipocampo em populações de pacientes pediátricos com TAB. A presença de diversos achados em estudos de ^1H -ERM em crianças e adolescentes pode estar associada ao fato da doença ser mais grave quando iniciada em idades mais precoces e, portanto, com uma fisiopatologia distinta daquela presente em pacientes que iniciaram a doença na fase adulta. Por conseguinte, resultados dessa natureza não são inconsistentes com os nossos e com a hipótese de que pacientes de PEM não evoluíram ainda com alterações neuroquímicas no hipocampo.

Podemos certificar, no entanto, que o desenho de nosso estudo não é capaz de confirmar a hipótese da ausência de alteração neuroquímica ser devido à fase inicial da doença. Para isso, seria necessário comparar os controles e os pacientes de primeiro episódio com um grupo de pacientes crônicos ou a realização de estudos longitudinais. Até o momento não há estudos publicados com esses desenhos específicos, que tenham utilizado a ^1H -ERM. Em nosso caso, não foi possível realizar a comparação com pacientes crônicos, dado que foi utilizada uma amostra de pacientes proveniente de um serviço voltado para o atendimento do primeiro episódio da mania. Todavia, ressaltamos que esses pacientes serão seguidos com exames de ^1H -ERM pelos próximos anos, o que nos fornecerá a possibilidade de confirmar ou não a hipótese de alteração dos metabólitos como um efeito da progressão da doença.

7.3.2 Possível ausência de alteração dos metabólitos no hipocampo de pacientes com TAB

Não é possível deixar de considerar, em um segundo momento, que nossos resultados negativos possam ter ocorrido devido à ausência de um efeito da doença na neuroquímica do hipocampo de pacientes com TAB. Seria uma hipótese consistente com os estudos de ^1H -ERM realizados em pacientes crônicos e que tiveram resultados negativos e também com os achados de muitos estudos de neuroimagem, realizados ao longo dos últimos anos, que não encontraram diferenças de volume no hipocampo de pacientes com TAB e controles, o que poderia significar que essa seria uma região não afetada pela doença. De fato, para todos os metabólitos investigados existem estudos negativos, mesmo em amostras de pacientes crônicos. Por exemplo, dos oito estudos realizados no hipocampo até o momento, todos investigaram NAA e GPC+PC, sendo que dois estudos não encontraram diferenças entre os grupos para o NAA (Colla et al., 2009; Senaratne et al., 2009) e cinco não encontraram diferenças ao investigar os compostos de colina (Bertolino et al., 2003; Deicken et al., 2003, Atmaca et al., 2006; Scherk et al., 2008; Colla et al., 2009). Apenas três deles investigaram a PCr+Cr e um também não encontrou diferenças entre os grupos (Colla et al., 2009). Quanto ao glutamato, esse metabólito foi investigado apenas por dois estudos (Colla et al., 2009; Senaratne et al., 2009) e um deles não encontrou diferenças entre os grupos (Senaratne et al., 2009). O único estudo que investigou mI no hipocampo não encontrou diferenças entre os grupos de pacientes com TAB e controles (Scherk et al., 2008).

No entanto, a hipótese de ausência de efeito da doença sobre o hipocampo de pacientes com TAB é menos provável à luz dos estudos realizados com outras abordagens e que tem identificado alterações no hipocampo de pacientes com TAB,

como evidenciado por estudos estereológicos, de expressão gênica e neuropsicológicos revisados na introdução. Além disso, tem se evidenciado mais recentemente que a ausência de alterações volumétricas no hipocampo de pacientes com TAB está provavelmente associada a um efeito neurotrófico do lítio, que age em diversas cascatas intracelulares que promovem a sinaptogênese e a plasticidade neuronal e quando se exclui o efeito desse medicamento, se observa redução volumétrica nessa estrutura (Hallahan et al., 2011). Portanto, observando-se a literatura como um todo, é provável que o hipocampo seja afetado pela doença bipolar e o fato dessas alterações não terem sido encontradas em nossa amostra deve-se, provavelmente, à influência de outras variáveis, que não à presença ou ausência da doença. Como foi argumentado acima, o mais provável é que esse resultado tenha ocorrido devido à curta duração da doença em nossos pacientes.

7.4 Associações dos níveis de metabólitos com as características clínicas da amostra

7.4.1 A influência do estado de humor

Um fator que poderia ter influenciado nossos resultados é o estado do humor, porque em nosso estudo foram incluídos pacientes em diferentes episódios, apesar da maioria (63,8%) estar em eutímia. A não exclusão de pacientes que estavam em um episódio do humor (hipomania, depressão ou estado misto) permitiu a investigação do efeito do humor nos metabólitos. A presença de depressão ocorreu em um número suficiente de pacientes (27,6%, $n = 16$) para que pudéssemos compará-los com os pacientes eutímicos, o que demonstrou não haver diferenças entre os grupos. Não foi

realizada a comparação com outros estados de humor devido ao número reduzido de pacientes nesses grupos. A comparação realizada evidencia que a presença de sintomas de depressão em alguns pacientes provavelmente não interferiu com os nossos resultados. Da mesma forma, a pesquisa de correlações entre níveis de metabólitos e as escalas que avaliaram os sintomas depressivos e maníacos (HAMD e YMRS) não mostrou um efeito do humor nos níveis dos mesmos. É importante notar que, na média, a presença de sintomas de mania e depressão foi bastante reduzida, como pudemos observar através das médias das escalas de Hamilton (escore médio = 6,53) e Young (escore médio = 3,47), realizadas no momento do exame. Sobre a influência do estado de humor na neuroquímica cerebral, pode-se dizer que ainda não está elucidada. Estudos no hipocampo foram realizados com pacientes em diferentes estados e reduções do NAA foram encontradas em mania (Atmaca et al., 2006), depressão (Atmaca et al., 2012) e eutímia (Deicken et al., 2003; Scherk et al., 2008). Aumento de GPC+PC foi identificado em pacientes eutímicos (Iosifescu et al., 2009; Senaratne et al., 2009) e depressivos (Atmaca et al., 2012) e glutamato foi encontrado aumentado em pacientes eutímicos (Colla et al., 2009). Porém, o desenho dos estudos comparando pacientes e controles não permite estabelecer se a alteração se deve ao estado de humor ou à doença. Estudos que comparassem os mesmos pacientes em diferentes estados do humor poderiam auxiliar no entendimento dessa questão.

Um estudo, no entanto, descreve o achado de diminuição de NAA no hipocampo de pacientes no primeiro episódio de mania (Atmaca et al., 2006), o que sugere que esta alteração não está exclusivamente associada à cronicidade da doença e poderia estar associada à presença do estado de humor maníaco. De acordo com essa hipótese, é possível que a redução do NAA seja agravada pela presença de mania, que tem sido associada com dano neuronal agudo. A hipótese da influência dos sintomas maníacos é

corroborada pelos resultados de Olvera et al. (2007), que identificaram uma forte correlação negativa ($r = -0,61$) entre os resultados da YMRS e os níveis de NAA no CPFDL esquerdo de pacientes pediátricos com TAB. Além disso, em um estudo que utilizou a olanzapina para o tratamento de um episódio maníaco, os autores observaram que os pacientes que não tinham remissão da mania não mostravam um aumento do NAA como os que tinham remissão, indicando que a presença de sintomas maníacos pode estar associada à diminuição de NAA. Na mesma linha, uma associação positiva entre a redução dos escores da YMRS e o aumento do NAA foi descrita nesse estudo (DelBello et al., 2006). Outras abordagens têm observado o efeito tóxico cerebral do estado de mania. Por exemplo, um estudo investigou as medidas de SOD e o TBARS no plasma de pacientes com TAB em diferentes estados de humor e identificou a mania como o estado com a presença de maior estresse oxidativo (Kunz et al., 2008). Em nosso estudo, 91,4% ($n = 53$) dos pacientes estavam totalmente recuperados da mania, o que pode ter evitado a influência de sintomas dessa fase nos níveis de NAA e contribuído para os nossos resultados, além do possível efeito associado à duração da doença, descrito acima. Estudos comparando pacientes eutímicos e pacientes durante a mania no início da doença são necessários para melhor compreender os fatores relacionados a danos e morte neuronal no curso do TAB.

7.4.2 A influência dos medicamentos

Estudos investigando o efeito de medicações utilizadas para o tratamento do TAB sobre os metabólitos têm sido realizados e têm encontrado evidências de que o uso de medicamentos possa representar um fator de confusão nos estudos de espectroscopia. Os estudos com lítio têm apontado na direção de um possível efeito de aumento do

NAA produzido por esse medicamento. Um estudo relatou que a administração de lítio por quatro semanas para os pacientes bipolares depressivos foi associada com maiores concentrações de NAA nas regiões frontal, parietal, temporal e occipital (Moore et al., 2000). Estudos transversais que compararam pacientes usuários de lítio e controles também identificaram níveis maiores de NAA nos usuários de lítio nos gânglios da base (Sharma et al., 1992) e no lobo temporal (Silverstone et al., 2003). No cíngulo anterior, Forester et al. (2008) investigaram nove pacientes com TAB tipo I, todos tratados com lítio e encontraram uma correlação positiva entre os níveis de NAA e os níveis cerebrais de lítio. Contudo, outro estudo longitudinal realizado por Friedman et al. (2004) não demonstrou aumento dos níveis de NAA associado ao uso de lítio em várias áreas do cérebro (substância branca frontal, cíngulo, caudado, putâmen, insula e lobo parietal). Outro estudo, esse com pacientes pediátricos com TAB, também não encontrou alterações dos níveis de NAA após uma semana de tratamento com lítio (Davanzo et al., 2001). Um resultado oposto ao estudo de Moore et al. (2000) foi encontrado por Patel et al. (2008) em pacientes pediátricos portadores de TAB, que observaram diminuição dos níveis de NAA no córtex pré-frontal medial após 6 semanas de tratamento com lítio.

Um estudo recente que procurou investigar essa questão, comparou pacientes bipolares em uso de lítio por ao menos dois anos com pacientes bipolares cujo uso de lítio na vida tinha sido menor que três meses e controles saudáveis (Hajek et al., 2013). Os níveis de NAA no lobo pré-frontal à esquerda foram mais baixos em pacientes não usuários de lítio quando comparados a usuários de lítio e controles. Os usuários de lítio e controles não apresentaram diferenças entre eles quanto aos níveis de NAA. O interessante é que os autores controlaram os grupos de pacientes para o número de episódios e duração da doença, ou seja, os pacientes usuários de lítio, mesmo tendo uma

sobrecarga de doença semelhante aos não usuários, apresentaram níveis de NAA iguais aos controles. Esses achados corroboram para a hipótese do efeito neuroprotetor do lítio.

Estudos de ^1H -ERM tem investigado o efeito do lítio sobre o mio-inositol. É sabido que o lítio exerce influência no sistema do fosfatidilinositol, visto que é um inibidor não-competitivo da inositol-1-fosfatase (Berridge et al., 1989; Williams et al., 2002). Estudos pré-clínicos sugerem que a inibição causada pelo lítio pode levar à diminuição do pool de inositol e isso pode estar relacionado aos efeitos terapêuticos do lítio. Moore et al. (1999), em um estudo que utilizou a ^1H -ERM, relataram que a administração por curto e longo prazo de lítio diminuiu os níveis de mI frontais em cerca de 30% em pacientes com TAB durante o seu seguimento longitudinal. Tal efeito do tratamento com lítio sobre o mI também foi observado em crianças com TAB por Davanzo et al. (2001). Esses autores observaram que o uso de lítio por apenas uma semana diminuiu os níveis de mI no cíngulo desses pacientes. Por outro lado, um estudo transversal não encontrou diferença de mI entre os pacientes tratados com lítio, aqueles tratados com valproato e controles (Silverstone et al., 2002). Alguns estudos, no entanto, relataram resultados no sentido contrário, ou seja, um aumento dos níveis de mI em pacientes usuários de lítio quando comparados com controles (Sharma et al., 1992) e também quando comparados com pacientes em uso de valproato (Friedman et al., 2004). Forester et al. (2008) encontraram uma correlação positiva entre os níveis cerebrais de lítio e os níveis de mI no cíngulo de pacientes com TAB. Outro estudo longitudinal que acompanhou 28 pacientes pediátricos em uso de 6 semanas de lítio encontrou aumento dos níveis de mI após esse período de seguimento (Patel et al., 2006). Como a maioria dos pacientes do nosso estudo estava usando medicação, e muitos deles usando lítio, não é possível descartar uma influência deste medicamento sobre os níveis de mI, o que pode supostamente ter levado a uma normalização desse

metabólito nos pacientes com TAB, e seria uma causa concorrente para a ausência de diferença com os controles, além do que foi discutido acima a respeito do efeito da duração da doença.

Outros medicamentos demonstraram provocar aumento do NAA, como a galantamina, no TAB (Iosifescu et al., 2009) e antipsicóticos, em pacientes com esquizofrenia (Bertolino et al., 2001). Contudo, esses estudos com medicamentos possuem a limitação de não serem capazes de definir se as mudanças em níveis de metabólitos se devem ao efeito dos medicamentos ou à melhora sintomática. Em nosso estudo, não encontramos diferenças no NAA entre pacientes em uso de lítio ou divalproato.

Nossos resultados mostraram que os níveis de PCr+Cr foram maiores nos pacientes em uso de lítio no hipocampo direito quando comparados com usuários de divalproato. No entanto, não foi observada diferença entre ambos os subgrupos de pacientes usando valproato ou lítio e os controles saudáveis, quando analisados separadamente. A ausência de diferença com os controles demonstra que o estabilizador do humor utilizado não interferiu com os achados principais do estudo. Para podermos atribuir esse aumento de PCr+Cr a um efeito do lítio, o que poderia refletir um possível efeito promotor do metabolismo celular causado por esse medicamento, teríamos que ter avaliado os pacientes com um exame de ^1H -ERM antes e depois do uso desta medicação e ainda controlado para os possíveis efeitos da remissão do quadro. Não há estudos que relataram qualquer efeito dos estabilizadores do humor nos níveis de PCr+Cr até o momento. Em nosso estudo, a interpretação do efeito dos medicamentos sobre os metabólitos ficou comprometida também pelo fato da maioria dos pacientes estarem polimedicados. No entanto, trata-se de um achado inicial que deve ser mais bem investigado por estudos futuros.

Estudos também tem investigado o efeito das medicações sobre o sinal de GPC+PC em pacientes com TAB. Wu et al. (2004) encontraram menores níveis de GPC+PC em pacientes tratados com lítio (n = 14) e também em pacientes tratados com valproato (n = 11) quando comparados com controles. O resultado oposto foi encontrado por Sharma et al. (1992), que investigaram nove pacientes tratados com lítio (nem todos eram bipolares) e identificaram aumento dos níveis de GPC+PC quando comparados com controles. A maioria dos estudos, contudo, não encontrou efeitos de medicações nos níveis de GPC+PC, principalmente do lítio (Stoll et al., 1992; Kato et al., 1996; Friedman et al., 2004; Frye et al., 2007; Forester et al., 2008), mesmo resultado em pacientes pediátricos com TAB (Patel et al., 2006; Davanzo et al., 2001). A colina foi testada como tratamento em pacientes bipolares com ciclagem rápida e refratários ao tratamento. Ela produziu melhora dos sintomas depressivos e o aumento dos níveis de GPC+PC nos gânglios da base (Stoll et al., 1996). No entanto, um ensaio clínico duplo cego não confirmou a eficácia superior do tratamento de colina em relação ao placebo (Lyoo et al., 2003).

Alguns estudos que examinaram os efeitos de medicamentos sobre as medidas de Glx foram realizados. Tratamento com lítio, mas não valproato, parece diminuir os níveis de Glx na substância cinzenta em estudo realizado no cérebro como um todo (Friedman et al., 2004). O tratamento de 12 semanas com lamotrigina levou a uma diminuição da glutamina, mas não do glutamato, naqueles pacientes que remitiram da depressão, mas não nos pacientes não remitidos (Frye et al., 2007). Doze semanas de suplementação de citidina, um agente da dieta que exerce ação sobre o ciclo glutamato-glutamina levou à diminuição dos níveis pré-frontais de Glx em pacientes com depressão bipolar em relação à suplementação de placebo (Yoon et al., 2009).

Portanto, existem estudos suficientes para indicar que medicamentos psicotrópicos utilizados para o tratamento do TAB, principalmente o lítio, podem ter alguma influência sobre os metabólitos medidos pela ^1H -ERM. Porém, os resultados são ainda contraditórios e mais estudos são necessários para o esclarecimento dessa questão.

7.4.3 A influência do uso de substâncias

Outro aspecto importante com relação à nossa amostra de pacientes é que não foram excluídos aqueles que eram dependentes de álcool e drogas. Assim, 40% dos pacientes faziam abuso ou eram dependentes dessas substâncias. Essa abordagem está em desacordo com a maioria dos estudos de ^1H -ERM, já que se suspeita que o uso de substâncias possa levar a alterações dos metabólitos, o que poderia ser um fator confundidor quanto ao efeito da doença. No entanto, o fato de nosso estudo ter utilizado uma amostra considerada grande possibilitou a comparação entre os subgrupos de usuários e não usuários. A comparação demonstrou que o álcool e as drogas não interferiram nos níveis dos metabólitos NAA, GPC+PC, PCr+Cr e Glx. Porém, níveis mais baixos de mI foram encontrados em pacientes com abuso/dependência de substâncias no hipocampo direito, quando comparados com pacientes sem abuso/dependência de substâncias. Na comparação com controles saudáveis, os pacientes usuários de substâncias também apresentaram menores níveis de mI no hipocampo direito. Esse achado sugere a existência de patologia glial ou alterações na via do inositol na presença de ambas as doenças. A influência do álcool para diminuir os níveis de mI foi descrita em um estudo anterior com pacientes bipolares que apresentavam comorbidade com dependência dessa substância (Nery et al., 2010). No entanto, diversos estudos em amostras de usuários de substâncias (sem transtorno

bipolar) têm encontrado aumento dos níveis de mI quando comparados a controles, por exemplo, devido ao uso de metanfetaminas (Ernst et al., 2000), ecstasy (Chang et al., 1999a) e cocaína (Chang et al., 1999b) ou na abstinência do álcool (Schweinsburg et al., 2000). Mais estudos de ^1H -ERM são necessários para esclarecer o efeito do uso de substâncias nos níveis dos metabólitos.

7.4.4 Outras influências observadas

As associações encontradas entre os metabólitos (GPC+PC, PCr+Cr, mI, Glx) e a idade nos indivíduos saudáveis nos mostra o quão importante é a inclusão dessa variável como uma covariável no modelo de ANCOVA para investigar diferenças entre os grupos. Alguns estudos têm encontrado associações dos metabólitos com a idade, inclusive em pacientes e não está claro porque os metabólitos medidos nos pacientes de nosso estudo não tiveram associação com essa variável. O estudo de Olvera et al. (2007) relatou uma correlação positiva entre NAA e idade no CPFDL E de crianças e adolescentes com TAB, o mesmo achado de Winsberg et al. (2000) na mesma área em adultos. Bhagwagar et al. (2007) encontraram uma associação negativa entre NAA/PCr+Cr e idade em pacientes adultos com TAB na região parieto-occipital. É importante notar que os grupos de pacientes e controles investigados em nosso estudo apresentavam uma variação pequena na idade, o que torna esse achado mais surpreendente.

Outra associação importante encontrada foi entre os níveis de NAA e GPC+PC e o volume de substância cinzenta do hipocampo nos pacientes e a associação dos níveis de GPC+PC e PCr+Cr com o volume de substância cinzenta no hipocampo de controles saudáveis. Todas as associações foram positivas. Isso mostra que os níveis de

metabólitos estão diretamente ligados à quantidade de substância cinzenta no voxel investigado. Decorre daí a importância de realizar a segmentação para quantificação dos volumes nos estudos de ^1H -ERM no intuito de evitar que essa seja uma variável confundidora. Em nosso estudo, os pacientes tiveram valores menores de substância cinzenta em relação aos controles e por isso essa variável foi utilizada como co-variável em nosso modelo de ANCOVA. Não está claro por que os outros metabólitos não se mostraram correlacionados com o volume de substância cinzenta.

7.5 Limitações e vantagens do estudo

Algumas limitações em nosso estudo devem ser consideradas. Os pacientes estavam recebendo tratamento farmacológico múltiplo. Estudos recentes, como descrito acima, têm demonstrado o efeito de medicamentos psiquiátricos em alguns metabólitos. Outra questão é que apenas o hipocampo foi investigado neste estudo. Portanto, os nossos resultados não podem ser generalizados para outras regiões do cérebro que podem estar associadas com a fisiopatologia do TAB. O estudo não foi projetado para investigar a influência do estado de humor, medicação ou abuso de drogas, o que torna a análise dessas características uma tarefa exploratória. Há também vantagens específicas do nosso estudo, principalmente em relação à amostra, a qual é maior em tamanho do que as amostras dos estudos anteriores e mais homogênea em relação ao estágio da doença. Outro aspecto importante é a medida do volume de substância cinzenta do voxel, permitindo que essa variável tenha sido utilizada como covariável na análise estatística dos dados.

8 CONCLUSÃO

Como conclusão, este estudo demonstrou que pacientes com TAB em início da doença não apresentam alterações neuroquímicas medidas pela ^1H -ERM nos hipocampus de ambos os hemisférios cerebrais, quando comparados com controles saudáveis. A ausência dessas alterações sugere não haver maior vulnerabilidade neuronal ou alterações do metabolismo celular, da via do fosfatidil-inositol e do sistema glutamatérgico no início da doença.

Este resultado não está de acordo com as hipóteses desta tese, que foram formuladas com base em estudos semelhantes, porém, na grande maioria dos casos, realizados em amostras de pacientes crônicos. É possível que as alterações nos níveis dos metabólitos, encontradas em outros estudos do hipocampo, estejam associadas à progressão da doença, como ocorre com outras alterações fisiopatológicas que são encontradas apenas em pacientes crônicos. Estudos utilizando diferentes métodos sugerem a existência de alterações neurobiológicas distintas de acordo com o estágio da doença. Estudos de seguimento utilizando a ^1H -ERM são necessários para confirmar esta hipótese.

9 REFERÊNCIAS

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.

Abreu LN, Lafer B, Baca-Garcia E, Oquendo MA. Suicidal ideation and suicide attempts in bipolar disorder type I: an update for the clinician. *Rev Bras Psiquiatr*. 2009;31:271-80.

Adler CM, Levine AD, DelBello MP, Strakowski SM. Changes in gray matter volume in patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;58:151-7.

Ahearn EP, Steffens DC, Cassidy F, Van Meter SA, Provenzale JM, Seldin MF, Weisler RH, Krishnan KR. Familial leukoencephalopathy in bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 1998;155:1605-7.

Ahn KH, Lyoo IK, Lee HK, Song IC, Oh JS, Hwang J, Kwon J, Kim MJ, Kim M, Renshaw PF. White matter hyperintensities in subjects with bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2004;58:516-21.

Aliyazicioğlu R, Kural B, Colak M, Karahan SC, Ayvaz S, Değer O. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. *Tohoku J Exp Med*. 2007;213:79-87.

Allen PJ. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36:1442-62.

Al-Mousawi AH, Evans N, Ebmeier KP, Roeda D, Chaloner F, Ashcroft GW. Limbic dysfunction in schizophrenia and mania. A study using 18F-labelled fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Br J Psychiatry*. 1996;169:509-16.

Altamura C, Mauri M, Ferrara A, Moro A, D'Andrea G, Zamberlan F. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. *Am J Psychiatry*. 1993;150:1731-3.

Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press; 2007. Chap. 3, p.37-114.

Amaral JA, Tamada RS, Issler CK, Caetano SC, Cerri GG, de Castro CC, Lafer B. A ¹H MRS study of the anterior cingulate gyrus in euthymic bipolar patients. *Hum Psychopharmacol*. 2006;21:215-20.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4th ed. Text revision. Washington (DC): APA; 2000.

Andreazza A, Kauer-Sant'anna M, Frey B, Bond D, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord*. 2008;111:135-44.

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;41:523-9.

Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, Gonçalves CA, Kapczinski F. 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, 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;34:263-71.

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.

- Arnone D, Cavanagh J, Gerber D, Lawrie S, Ebmeier K, McIntosh A. Magnetic resonance imaging studies in bipolar disorder and schizophrenia: meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009;195:194-201.
- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2003;34:325-37.
- Atmaca, M, Yildirim H. Altered neurochemical ingredient of hippocampus in patients with bipolar depression. *Depress Res Treat*. Volume 2012, artigo número 485249, 6 pp.
- Atmaca M, Yildirim H, Ozdemir H, Poyraz AK, Tezcan E, Ogur E. Hippocampal ^1H MRS in first-episode bipolar I patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006;30:1235-9.
- Bäckström P, Hyytiä P. Attenuation of cocaine-seeking behaviour by the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;166:69-76.
- Balázs J, Lecrubier Y, Csiszér N, Koszták J, Bitter I. Prevalence and comorbidity of affective disorders in persons making suicide attempts in Hungary: importance of the first depressive episodes and of bipolar II diagnoses. *J Affect Disord*. 2003;76:113-9.
- Bates TE, Strangward M, Keelan J, Davey GP, Munro PM, Clark JB. Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for ^1H -MRS studies in vivo. *Neuroreport*. 1996;7:1397-400.
- Bauer M, Beaulieu S, Dunner DL, Lafer B, Kupka R. Rapid cycling bipolar disorder--diagnostic concepts. *Bipolar Disord*. 2008;10:153-62.
- Bauer M, Pfennig A. Epidemiology of bipolar disorders. *Epilepsia*. 2005;46(Suppl 4):8-13.
- Bearden CE, Glahn DC, Monkul ES, Barrett J, Najt P, Kaur S, Sanches M, Villarreal V, Bowden C, Soares JC. Sources of declarative memory impairment in bipolar disorder: mnemonic processes and clinical features. *J Psychiatr Res*. 2006; 40:47-58.

Becker S, Wojtowicz JM. A model of hippocampal neurogenesis in memory and mood disorders. *Trends Cogn Sci*. 2007;11:70-6.

Benes FM, Kwok EW, Vincent SL, Todtenkopf MS. The reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic-depressives. *Biol Psychiatry*. 1998;44:88-97.

Benes FM, Vincent SL, Todtenkopf M. The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in prefrontal cortex of schizophrenia and bipolar subjects. *Biol Psychiatry*. 2001;50:395-406.

Beneyto M, Meador-Woodruff J. Lamina-specific abnormalities of AMPA receptor trafficking and signaling molecule transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Synapse*. 2006;60:585-98.

Berk M, Hallam K, Malhi GS, Henry L, Hasty M, Macneil C, Yucel M, Pantelis C, Murphy B, Vieta E, Dodd S, McGorry PD. Evidence and implications for early intervention in bipolar disorder. *J Ment Health*. 2010;19:113-26.

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;35:804-17.

Berretta S, Pantazopoulos H, Lange H. Neuron numbers and volume of the amygdala in subjects diagnosed with bipolar disorder or schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2007;62:884-93.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell*. 1989;59:411-9.

- Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Weidenhammer KM, Rakow R, Egan MF, Weinberger DR. The effect of treatment with antipsychotic drugs on brain N-acetylaspartate measures in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2001;49:39-46.
- 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;53:906-13.
- Bezhlibnyk YB, Sun X, Wang J, MacQueen GM, McEwen BS, Young LT. Neuron somal size is decreased in the lateral amygdalar nucleus of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2007;32:203-10.
- Bhagwagar Z, Wylezinska M, Jezzard P, Evans J, Ashworth F, Sule A, Matthews PM, Cowen PJ. Reduction in occipital cortex gamma-aminobutyric acid concentrations in medication-free recovered unipolar depressed and bipolar subjects. *Biol Psychiatry*. 2007;61:806-12.
- Bluml S. In vivo quantitation of cerebral metabolite concentrations using natural abundance ^{13}C MRS at 1.5 T. *J Magn Reson*. 1999;136:219-25.
- Bothwell JH, Rae C, Dixon RM, Styles P, Bhakoo KK. Hypo-osmotic swelling-activated release of organic osmolytes in brain slices: implications for brain oedema in vivo. *J Neurochem*. 2001;77:1632-40.
- Bouras C, Kövari E, Hof PR, Riederer BM, Giannakopoulos P. Previous cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathol*. 2001;102:373-9.
- Brady RO Jr, Cooper A, Jensen JE, Tandon N, Cohen B, Renshaw P, Keshavan M, Öngür D. A longitudinal pilot proton MRS investigation of the manic and euthymic states of bipolar disorder. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e160.

- Brambilla P, Stanley JA, Nicoletti MA, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, Kupfer D, Keshavan MS, Soares JC. ^1H magnetic resonance spectroscopy investigation of the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder patients. *J Affect Disord*. 2005;86:61-7.
- Brenner RE, Munro PM, Williams SC, Bell JD, Barker GJ, Hawkins CP, Landon DN, McDonald WI. The proton NMR spectrum in acute EAE: the significance of the change in the Cho:Cr ratio. *Magn Reson Med*. 1993;29:737-45.
- Brietzke E, Moreira CL, Duarte SV, Nery FG, Kapczinski F, Miranda Scippa Â, Lafer B. Impact of comorbid migraine on the clinical course of bipolar disorder. *Compr Psychiatry*. 2012;53:809-12.
- Brietzke E, Moreira CL, Toniolo RA, Lafer B. Clinical correlates of eating disorder comorbidity in women with bipolar disorder type I. *J Affect Disord*. 2011;130:162-5.
- Bruckheimer EM, Cho SH, Sarkiss M, Herrmann J, McDonnell TJ. The Bcl-2 gene family and apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 1998;62:75-105.
- Byne W, Tatusov A, Yiannoulos G, Vong GS, Marcus S. Effects of mental illness and aging in two thalamic nuclei. *Schizophr Res*. 2008;106:172-81.
- Caetano SC, Olvera RL, Hatch JP, Sanches M, Chen HH, Nicoletti M, Stanley JA, Fonseca M, Hunter K, Lafer B, Pliszka SR, Soares JC. Lower N-acetyl-aspartate levels in prefrontal cortices in pediatric bipolar disorder: a ^1H magnetic resonance spectroscopy study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2011;50:85-94.
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2004;161:598-607.
- Casamassima F, Hay AC, Benedetti A, Lattanzi L, Cassano GB, Perlis RH. L-type calcium channels and psychiatric disorders: A brief review. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010;153:1373-90.

- Castillo M, Kwock L, Courvoisie H, Hooper SR. Proton MR spectroscopy in children with bipolar affective disorder: preliminary observations. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21:832-8.
- Cataldo AM, McPhie DL, Lange NT, Punzell S, Elmiligy S, Ye NZ, Froimowitz MP, Hassinger LC, Menesale EB, Sargent LW, Logan DJ, Carpenter AE, Cohen BM. Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. *Am J Pathol*. 2010;177:575-85.
- Cavassila S, Deval S, Huegen C, van Ormondt D, Graveron-Demilly D. Cramér-Rao bounds: an evaluation tool for quantitation. *NMR Biomed*. 2001;14:278-83.
- Cecil KM, DelBello MP, Morey R, Strakowski SM. Frontal lobe differences in bipolar disorder as determined by proton MR spectroscopy. *Bipolar Disord*. 2002;4:357-65.
- Cecil KM, DelBello MP, Sellars MC, Strakowski SM. Proton magnetic resonance spectroscopy of the frontal lobe and cerebellar vermis in children with a mood disorder and a familial risk for bipolar disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2003;13:545-55.
- Cerullo MA, Adler CM, Delbello MP, Strakowski SM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry*. 2009;21:314-22.
- Chana G, Landau S, Beasley C, Everall IP, Cotter D. Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the prefrontal cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biol Psychiatry*. 2003;53:1086-98.
- 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;53:1059-65.

- Chang L, Ernst T, Grob CS, Poland RE. Cerebral (1)H MRS alterations in recreational 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) users. *J Magn Reson Imaging*. 1999a;10:521-6.
- Chang L, Ernst T, Strickland T, Mehringer CM. Gender effects on persistent cerebral metabolite changes in the frontal lobes of abstinent cocaine users. *Am J Psychiatry*. 1999b;156:716-22.
- Che Y, Wang JF, Shao L, Young T. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. *J Psychiatry Neurosci*. 2010;35:296-302.
- Chen BK, Sassi R, Axelson D, Hatch JP, Sanches M, Nicoletti M, Brambilla P, Keshavan MS, Ryan ND, Birmaher B, Soares JC. Cross-sectional study of abnormal amygdala development in adolescents and young adults with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2004;56:399-405.
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem*. 2000;75:1729-34.
- Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem*. 1999;274:6039-42.
- Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, Kanai H, Hough C, Hiroi T, Leeds P. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord*. 2002;4:129-36.
- Clinton SM, Meador-Woodruff JH. Abnormalities of the NMDA Receptor and associated intracellular molecules in the thalamus in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:1353-62.

- Colino, A, García-Seoane JJ, Valentín A. Action potential broadening induced by lithium may cause a presynaptic enhancement of excitatory synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 1998;10:2433-43.
- Colla M, Schubert F, Bubner M, Heidenreich J, Bajbouj M, Seifert F, Luborzewski A, Heuser I, Kronenberg G. Glutamate as a spectroscopic marker of hippocampal structural plasticity is elevated in long-term euthymic bipolar patients on chronic lithium therapy and correlates inversely with diurnal cortisol. *Mol Psychiatry*. 2009;14:696-704.
- Cotter D, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G, MacMillan L, Everall I. The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labeled using calcium binding proteins, in the previous cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2002a;51:377-86.
- Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex*. 2002b;12:386-94.
- Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall L. Reduced glial cell density and neuronal size in the previous cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;58:545-53.
- Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 2006;398:215-9.
- Curtis VA, Dixon TA, Morris RG, Bullmore ET, Brammer MJ, Williams SC, Sharma T, Murray RM, McGuire PK. Differential frontal activation in schizophrenia and bipolar illness during verbal fluency. *J Affect Disord*. 2001;66:111-21.
- Dager S, Friedman S, Parow A, Demopulos C, Stoll A, Lyoo I, Dunner DL, Renshaw PF. Brain metabolic alterations in medication-free patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:450-8.

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;24:359-69.

Davanzo P, Yue K, Thomas M, Belin T, Mintz J, Venkatraman T, 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;160:1442-52.

de Almeida KM, Moreira CL, Lafer B. Metabolic syndrome and bipolar disorder: what should psychiatrists know? *CNS Neurosci Ther*. 2012;18:160-6.

De Peri L, Crescini A, Deste G, Fusar-Poli P, Sacchetti E, Vita A. Brain structural abnormalities at the onset of schizophrenia and bipolar disorder: a meta-analysis of controlled magnetic resonance imaging studies. *Curr Pharm Des*. 2012;18:486-94.

de Sousa RT, van de Bilt MT, Diniz BS, Ladeira RB, Portela LV, Souza DO, Forlenza OV, Gattaz WF, Machado-Vieira R. Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. *Neurosci Lett*. 2011;494:54-6.

Deicken RF, Eliaz Y, Feiwell R, Schuff N. Increased thalamic N-acetylaspartate in male patients with familial bipolar I disorder. *Psychiatry Res*. 2001;106:35-45.

Deicken RF, Pegues MP, Anzalone S, Feiwell R, Soher B. Lower concentration of hippocampal N-acetylaspartate in familial bipolar I disorder. *Am J Psychiatry*. 2003;160:873-82.

DelBello MP, Cecil KM, Adler CM, Daniels JP, Strakowski SM. Neurochemical effects of olanzapine in first-hospitalization manic adolescents: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:1264-73.

- DelBello MP, Strakowski SM, Zimmerman ME, Hawkins JM, Sax KW. MRI analysis of the cerebellum in bipolar disorder: a pilot study. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 21:63-8.
- Demougeot C, Marie C, Giroud M, Beley A. N-acetylaspartate: a literature review of animal research on brain ischaemia. *J Neurochem*. 2004;90:776-83.
- Denicoff KD, Ali SO, Mirsky AF, Smith-Jackson EE, Leverich GS, Duncan CC, Connell EG, Post RM. Relationship between prior course of illness and neuropsychological functioning in patients with bipolar disorder. *J Affect Disord*. 1999; 56:67-73.
- Dienes KA, Hammen C, Henry RM, Cohen AN, Daley SE. The stress sensitization hypothesis: understanding the course of bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2006;95:43-9.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30: 379-87.
- Du J, Gray NA, Falke C, Yuan P, Szabo S, Manji HK. Structurally dissimilar antimanic agents modulate synaptic plasticity by regulating AMPA glutamate receptor subunit GluR1 synaptic expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1003:378-80.
- Duarte JM, Lei H, Mlynárik V, Gruetter R. The neurochemical profile quantified by in vivo ^1H NMR spectroscopy. *Neuroimage*. 2012;61:342-62.
- Elkis H, Friedman L, Wise A, Meltzer HY. Meta-analyses of studies of ventricular enlargement and cortical sulcal prominence in mood disorders. Comparisons with controls or patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1995;52:735-46.
- Ellison-Wright I, Bullmore E. Anatomy of bipolar disorder and schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res*. 2010;117:1-12.

- Engel SR, Creson TK, Hao Y, Shen Y, Maeng S, Nekrasova T, Landreth GE, Manji HK, Chen G. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the control of behavioral excitement. *Mol Psychiatry*. 2009;14:448-61.
- Ernst T, Chang L, Leonido-Yee M, Speck O. Evidence for long-term neurotoxicity associated with methamphetamine abuse: A ^1H MRS study. *Neurology*. 2000;54:1344-49.
- Fernandes BS, Gama CS, Ceresér KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, de Lucena D, Kunz M, Gomes FA, Kapczinski F. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res*. 2011;45:995-1004.
- Finch EA, Augustine GJ. Local calcium signalling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature*. 1998;396:753-6.
- Forester BP, Finn CT, Berlow YA, Wardrop M, Renshaw PF, Moore CM. Brain lithium, N-acetyl aspartate and myo-inositol levels in older adults with bipolar disorder treated with lithium: a lithium-7 and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Bipolar Disord*. 2008;10:691-700.
- Fornito A, Yücel M, Wood SJ, Bechdolf A, Carter S, Adamson C, Velakoulis D, Saling MM, McGorry PD, Pantelis C. Anterior cingulate cortex abnormalities associated with a first psychotic episode in bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2009;194:426-33.
- Fountoulakis KN, Giannakopoulos P, Kövari E, Bouras C. Assessing the role of cingulate cortex in bipolar disorder: neuropathological, structural and functional imaging data. *Brain Res Rev*. 2008;59:9-21.
- Franchini L, Zanardi R, Smeraldi E, Gasperini M. Early onset of lithium prophylaxis as a predictor of good long-term outcome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999;249:227-30.

Frey BN, Folgierini M, Nicoletti M, Machado-Vieira R, Stanley JA, Soares JC, Kapczinski F. A proton magnetic resonance spectroscopy investigation of the dorsolateral prefrontal cortex in acute mania. *Hum Psychopharmacol*. 2005;20: 133-9.

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):119-27.

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;56:340-8.

Frye MA, Perugi G. Comorbidity in bipolar disorder: a focus on addiction and anxiety disorders. In: Yatham LN, Maj M, editors. *Bipolar disorder – Clinical and neurobiological foundations*. Oxford: Willey-Blackwell; 2010. Chap. 4, p.31-43.

Frye MA, Thomas MA, Yue K, Binesh N, Davanzo P, Ventura J, O'Neill J, Guze B, Curran JG, Mintz J. Reduced concentrations of N-acetylaspartate (NAA) and the NAA-creatine ratio in the basal ganglia in bipolar disorder: a study using 3-Tesla proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Res*. 2007b;154:259-65.

Frye MA, Watzl J, Banakar S, O'Neill J, Mintz J, Davanzo P, Fisher J, Chirichigno JW, Ventura J, Elman S, Tsuang J, Walot I, Thomas MA. Increased anterior cingulate/medial prefrontal cortical glutamate and creatine in bipolar depression. *Neuropsychopharmacology*. 2007a;32:2490-9.

Gallelli KA, Wagner CM, Karchemskiy A, Howe M, Spielman D, Reiss A, Chang KD. N-acetylaspartate levels in bipolar offspring with and at high-risk for bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2005;7:589-97.

- Gascón S, Deogracias R, Sobrado M, Roda JM, Renart J, Rodríguez-Peña A, Díaz-Guerra M. Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Biol Chem*. 2005; 280:35018-27.
- Gebhardt C, Cull-Candy SG. Lithium acts as a potentiator of AMPAR currents in hippocampal CA1 cells by selectively increasing channel open probability. *J Physiol*. 2010;588:3933-41.
- 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.
- 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;14:478-87.
- Gigante AD, Young LT, Yatham LN, Andreazza AC, Nery FG, Grinberg LT, Heinsen H, Lafer B. Morphometric postmortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14:1075-89.
- Glahn DC, Bearden CE, Caetano S, Fonseca M, Najt P, Hunter K, Pliszka SR, Olvera RL, Soares JC. Declarative memory impairment in pediatric bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2005;7:546-54.
- Golgi C, Bentivoglio M, Swanson L. On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII). 1886. *Brain Res Bull*. 2001;54:461-83.
- Gould TD, Einat H, O'Donnell KC, Picchini AM, Schloesser RJ, Manji HK. Beta-catenin overexpression in the mouse brain phenocopies lithium-sensitive behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:2173-83.
- Gould TD, Manji HK. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1223-37.

Gould TD, Manji HK. The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *Neuroscientist*. 2002;8:497-511.

Gould TD, Picchini AM, Einat H, Manji HK. Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Curr Drug Targets*. 2006;7:1399-409.

Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*. 2000;1:67-73.

Gruber SA, Rosso IM, Yurgelun-Todd D. Neuropsychological performance predicts clinical recovery in bipolar patients. *J Affect Disord*. 2008;105:253-60.

Gunde E, Novak T, Kopecek M, Schmidt M, Propper L, Stopkova P, Höschl C, Duffy A, Alda M, Hajek T. White matter hyperintensities in affected and unaffected late teenage and early adulthood offspring of bipolar parents: a two-center high-risk study. *J Psychiatr Res*. 2011;45:76-82.

Guy W. Clinical Global Impressions. In: Guy W, editor. *ECDEU assessment manual for psychopharmacology*. Rockville: National Institute of Mental Health; 1976.

Hajek T, Cullis J, Novak T, Kopecek M, Blagdon R, Propper L, Stopkova P, Duffy A, Höschl C, Uher R, Paus T, Young LT, Alda M. Brain structural signature of familial predisposition for bipolar disorder: replicable evidence for involvement of the right inferior frontal gyrus. *Biol Psychiatry*. 2013;73:144-52.

Hajek T, Gunde E, Bernier D, Slaney C, Propper L, Grof P, Macqueen G, Duffy A, Alda M. Subgenual cingulate volumes in affected and unaffected offspring of bipolar parents. *J Affect Disord*. 2008;108:263-9.

Hajek T, Gunde E, Slaney C, Propper L, MacQueen G, Duffy A, Alda M. Amygdala and hippocampal volumes in relatives of patients with bipolar disorder: a high-risk study. *Can J Psychiatry*. 2009;54:726-33.

Hallahan B, Newell J, Soares JC, Brambilla P, Strakowski SM, Fleck DE, Kieseppä T, Altshuler LL, Fornito A, Malhi GS, McIntosh AM, Yurgelun-Todd DA, Labar KS, Sharma V, MacQueen GM, Murray RM, McDonald C. Structural magnetic resonance imaging in bipolar disorder: an international collaborative mega-analysis of individual adult patient data. *Biol Psychiatry*. 2011;69:326-35.

Hamakawa H, Kato T, Murashita J, Kato N. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the basal ganglia in patients with affective disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1998;248:53-8.

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;29:639-44.

Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2007;62:1310-16.

Hassel B, Dingledine R. Glutamate. In: Siegel GJ, Wayne Albers R, Brady ST, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. 7th ed. San Diego: Academic Press; 2006. p. 267-90.

Hirayasu Y, Shenton ME, Salisbury DF, Kwon JS, Wible CG, Fischer IA, Yurgelun-Todd D, Zarate C, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW. Subgenual cingulate cortex volume in first-episode psychosis. *Am J Psychiatry*. 1999;156:1091-3.

Hoekstra R, Fekkes D, Loonen A, Pepplinkhuizen L, Tuinier S, Verhoeven W. Bipolar mania and plasma amino acids: increased levels of glycine. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006;16:71-7.

Hotsenpiller G, Giorgetti M, Wolf ME. Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure. *Eur J Neurosci*. 2001;14:1843-1855.

- 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;46:247-55.
- Iosifescu DV, Moore CM, Deckersbach T, Tilley CA, Ostacher MJ, Sachs GS, Nierenberg AA. Galantamine-ER for cognitive dysfunction in bipolar disorder and correlation with hippocampal neuronal viability: a proof-of-concept study. *CNS Neurosci Ther*. 2009;15:309-19.
- 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;14:241-53.
- Izquierdo I, Cammarota M, Da Silva WC, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Mello P, Benetti F, Costa JC, Medina JH. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *An Acad Bras Cienc*. 2008;80:115-27.
- Jensen JE, Daniels M, Haws C, Bolo NR, Lyoo IK, Yoon SJ, Cohen BM, Stoll AL, Rusche JR, Renshaw PF. Triacetyluridine (TAU) decreases depressive symptoms and increases brain pH in bipolar patients. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2008;16:199-206.
- 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; 60:261-9.
- Judd LL, Schettler PJ. The long-term course and clinical management of bipolar I and bipolar II disorders. In: Yatham LN, Maj M, editors. *Bipolar disorder – Clinical and neurobiological foundations*. Oxford: Willey-Blackwell; 2010. Chap. 3, p.17-30.
- Kaladchibachi SA, Doble B, Anthopoulos N, Woodgett JR, Manoukian AS. Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: a molecular link in the therapeutic action of lithium. *J Circadian Rhythms*. 2007;5:3.

Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M, Brietzke E, Vázquez GH, Vieta E, Berk M. The potential use of biomarkers as an adjunctive tool for staging bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:1366-71.

Kapczinski F, Frey B, Kauer-Sant'Anna M, Grassi-Oliveira R. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*. 2008; 8:1101-13.

Kasai K, Shenton ME, Salisbury DF, Onitsuka T, Toner SK, Yurgelun-Todd D, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW. Differences and similarities in insular and temporal pole MRI gray matter volume abnormalities in first-episode schizophrenia and affective psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60:1069-77.

Kato T. Molecular neurobiology of bipolar disorder: a disease of 'mood-stabilizing neurons'? *Trends Neurosci*. 2008;31:495-503.

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;21:248-54.

Kato T, Kato N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2000;2: 180-90.

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;25:557-66.

Kato T, Stine OC, McMahon FJ, Crowe RR. Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brains in patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 1997; 42:871-75.

Kato T, Takahashi Y. Deletion of leukocyte mitochondrial DNA in bipolar disorder. *J Affect Disord*. 1996;37:67-73.

Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Inubushi T. Alterations in brain phosphorous metabolism in bipolar disorder detected by in vivo ^{31}P and ^7Li magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord.* 1993;27:53-9.

Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Murashita J, Hamakawa H, Inubushi T. Reduction of brain phosphocreatine in bipolar II disorder detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord.* 1994;31:125-33.

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;12:447-58.

Kaufman RE, Ostacher MJ, Marks EH, Simon NM, Sachs GS, Jensen JE, Renshaw PF, Pollack MH. Brain GABA levels in patients with bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33:427-34.

Kessing LV, Andersen PK, Mortensen PB. Predictors of recurrence in affective disorder. A case register study. *J Affect Disord.* 1998;49:101-8.

Kessing LV, Hansen MG, Andersen PK, Angst J. The predictive effect of episodes on the risk of recurrence in depressive and bipolar disorders - a life-long perspective. *Acta Psychiatr Scand.* 2004;109:339-44.

Ketter TA, Kimbrell TA, George MS, Dunn RT, Speer AM, Benson BE, Willis MW, Danielson A, Frye MA, Herscovitch P, Post RM. Effects of mood and subtype on cerebral glucose metabolism in treatment-resistant bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2001;49:97-109.

Kieseppä T, van Erp TG, Haukka J, Partonen T, Cannon TD, Poutanen VP, Kaprio J, Lönqvist J. Reduced left hemispheric white matter volume in twins with bipolar I disorder. *Biol Psychiatry.* 2003;54:896-905.

Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8455-9.

Koehl M, Abrous DN. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011;33:1101-14.

Kondo DG, Sung YH, Hellem TL, Delmastro KK, Jeong EK, Kim N, Shi X, Renshaw PF. Open-label uridine for treatment of depressed adolescents with bipolar disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2011;21:171-5.

Konradi C, Eaton M, MacDonald MI, Walsh J, Benes FM, Heckers S. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:300-8.

Koo MS, Levitt JJ, Salisbury DF, Nakamura M, Shenton ME, McCarley RW. A cross-sectional and longitudinal magnetic resonance imaging study of cingulate gyrus gray matter volume abnormalities in first-episode schizophrenia and first-episode affective psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65:746-60.

Kraepelin E. *Manic depressive insanity and paranoia*. Bristol: Thoemmes Press; 1921.

Kreis R. Issues of spectral quality in clinical ¹H-magnetic resonance spectroscopy and a gallery of artifacts. *NMR Biomed*. 2004;17:361-81.

Kristiansen L, Meador-Woodruff J. Abnormal striatal expression of transcripts encoding NMDA interacting PSD proteins in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Schizophr Res*. 2005;78:87-93.

Kubicki M, Shenton ME, Salisbury DF, Hirayasu Y, Kasai K, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW. Voxel-based morphometric analysis of gray matter in first episode schizophrenia. *Neuroimage*. 2002;17:1711-9.

- 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.
- Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32:1677-81.
- Ladouceur CD, Almeida JR, Birmaher B, Axelson DA, Nau S, Kalas C, Monk K, Kupfer DJ, Phillips ML. Subcortical gray matter volume abnormalities in healthy bipolar offspring: potential neuroanatomical risk marker for bipolar disorder? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2008; 47:532-9.
- Lafer, B, Renshaw PF, Sachs G, Christensen JD, Yurgelun-Todd D, Stoll AL, Rosenbaum JF, Cohenet BM. Proton MRS of the basal ganglia in bipolar disorder. *Biological Psychiatry.* 1994;35, 685.
- Lagopoulos J, Malhi GS. A functional magnetic resonance imaging study of emotional Stroop in euthymic bipolar disorder. *Neuroreport.* 2007;18:1583-87.
- Law AJ, Deakin JF. Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *Neuroreport.* 2001;12:2971-74.
- Law AJ, Harrison PJ. The distribution and morphology of prefrontal cortex pyramidal neurons identified using anti-neurofilament antibodies SMI32, N200 and FNP7. Normative data and a comparison in subjects with schizophrenia, bipolar disorder or major depression. *J Psychiatric Res.* 2003;37:487-99.
- Leach MJ, Marden CM, Miller AA. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neurochemical studies on the mechanism of action. *Epilepsia.* 1986;27:490-7.

Levi I, Eskira Y, Eisenstein M, Gilon C, Hoffman A, Talgan Y, Fanous J, Bersudsky Y, Belmaker R, Agam G, Almog O. Inhibition of inositol monophosphatase (IMPase) at the calbindin-D28k binding site: Molecular and behavioral aspects. *Eur Neuropsychopharmacol*. In press 2013.

Liu L, Schulz SC, Lee S, Reutiman TJ, Fatemi SH. Hippocampal CA1 pyramidal cell size is reduced in bipolar disorder. *Cell Mol Neurobiol*. 2007;27:351-8.

Lloyd AJ, Moore PB, Cousins DA, Thompson JM, McAllister VL, Hughes JH, Ferrier IN, Young AH. White matter lesions in euthymic patients with bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 2009;120:481-91.

Lochhead RA, Parsey RV, Oquendo MA, Mann JJ. Regional brain gray matter volume differences in patients with bipolar disorder as assessed by optimized voxel-based morphometry. *Biol Psychiatry*. 2004;55:1154-62.

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;12:557-67.

Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 2005;130:567-80.

Lyoo IK, Demopulos CM, Hirashima F, Ahn KH, Renshaw PF. Oral choline decreases brain purine levels in lithium-treated subjects with rapid-cycling bipolar disorder: a double-blind trial using proton and lithium magnetic resonance spectroscopy. *Bipolar Disord*. 2003;5:300-6.

Lyoo IK, Sung YH, Dager SR, Friedman SD, Lee JY, Kim SJ, Kim N, Dunner DL, Renshaw PF. Regional cerebral cortical thinning in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2006;8:65-74.

- Lyoo, K, Renshaw, PF. Functional magnetic resonance imaging, diffusion tensor imaging, and magnetic resonance spectroscopy in bipolar disorder. In: Yatham LN, Maj M, editors. *Bipolar disorder-clinical and neurobiological foundations*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010. Chap. 14, 133-99.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V Jr, 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;421:33-6.
- Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, Souza DO, Portela LV, Gentil V. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry*. 2007;61:142-4.
- MacQueen G, Young L, Joffe R. A review of psychosocial outcome in patients with bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 2001;103:163-70.
- Malhi GS, Ivanovski B, Wen W, Lagopoulos J, Moss K, Sachdev P. Measuring mania metabolites: a longitudinal proton spectroscopy study of hypomania. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 2007;434:57-66.
- Malhi GS, Lagopoulos J, Owen AM, Ivanovski B, Shnier R, Sachdev P. Reduced activation to implicit affect induction in euthymic bipolar patients: an fMRI study. *J Affect Disord*. 2007;97:109-22.
- Martínez-Arán A, Torrent C, Solé B, Bonnín CM, Rosa AR, Sánchez-Moreno J, Vieta E. Functional remediation for bipolar disorder. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2011;7:112-6.
- Martinowich K, Schloesser R, Manji H. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. *J Clin Invest*. 2009;119:726-36.

- Matsuo K, Kopecek M, Nicoletti MA, Hatch JP, Watanabe Y, Nery FG, Zunta-Soares G, Soares JC. New structural brain imaging endophenotype in bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2012;17:412-20.
- McCullumsmith R, Kristiansen L, Beneyto M, Scarr E, Dean B, Meador-Woodruff J. Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res*. 2007;1127:108-18.
- McDonald C, Marshall N, Sham PC, Bullmore ET, Schulze K, Chapple B, Bramon E, Filbey F, Quraishi S, Walshe M, Murray RM. Regional brain morphometry in patients with schizophrenia or bipolar disorder and their unaffected relatives. *Am J Psychiatry*. 2006;163:478-87.
- McElroy SL, Altshuler LL, Suppes T, Keck PE Jr, Frye MA, Denicoff KD, Nolen WA, Kupka RW, Leverich GS, Rochussen JR, Rush AJ, Post RM. Axis I psychiatric comorbidity and its relationship to historical illness variables in 288 patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2001;158:420-6.
- McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol*. 2001;16(Suppl 1):7-19.
- McIntosh AM, Job DE, Moorhead TW, Harrison LK, Forrester K, Lawrie SM, Johnstone EC. Voxel-based morphometry of patients with schizophrenia or bipolar disorder and their unaffected relatives. *Biol Psychiatry* 2004;56:544–52.
- McLean MA, Woermann FG, Barker GJ, Duncan JS. Quantitative analysis of short echo time (1)H-MRSI of cerebral gray and white matter. *Magn Reson Med*. 2000;44:401-11.
- Merikangas KR, Akiskal H, 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;64:543-52.

- Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE, Zarkov Z. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68:241-51.
- Michael N, Erfurth A, Ohrmann P, Gossling M, Arolt V, Heindel W, Pfleiderer B. Acute mania is accompanied by elevated glutamate/glutamine levels within the left dorsolateral prefrontal cortex. *Psychopharmacology*. 2003;168, 344-6.
- Michael N, Erfurth A, Pfleiderer B. Elevated metabolites within dorsolateral prefrontal cortex in rapid cycling bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2009;172:78-81.
- Miller BL, Chang L, Booth R, Ernst T, Cornford M, Nikas D, McBride D, Jenden DJ. In vivo ¹H MRS choline: correlation with in vitro chemistry/histology. *Life Sci*. 1996;58: 1929-35.
- Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 2006;100:433-42.
- Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 2007;81:89-131.
- Molina V, Sánchez J, Sanz J, Reig S, Benito C, Leal I, Sarramea F, Rebolledo R, Palomo T, Desco M. Dorsolateral prefrontal N-acetyl-aspartate concentration in male patients with chronic schizophrenia and with chronic bipolar disorder. *Eur Psychiatry*. 2007;22:505-12.
- Moore CM, Biederman J, Wozniak J, Mick E, Aleardi M, Wardrop M, Dougherty, Harpold T, Hammerness P, Randall E, Lyoo IK, Renshaw PF. Mania, glutamate/ glutamine and risperidone in pediatric bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study of the anterior cingulate cortex. *J Affect Disord*. 2007b;99:19-25.

Moore CM, Breeze JL, Gruber SA, Babb SM, Frederick BB, Villafuerte RA, Stoll AL, Hennen J, Yurgelun-Todd DA, Cohen BM, Renshaw PF. Choline, myo-inositol and mood in bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study of the anterior cingulate cortex. *Bipolar Disord.* 2000;2:207-16.

Moore CM, Frazier JA, Glod CA, Breeze JL, Dieterich M, Finn CT, Frederick Bd, Renshaw PF. Glutamine and glutamate levels in children and adolescents with bipolar disorder: a 4.0-T proton magnetic resonance spectroscopy study of the anterior cingulate cortex. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2007;46:524-34.

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.* 2000b;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;156:1902-8.

Moreno DH, Andrade LH. The lifetime prevalence, health services utilization and risk of suicide of bipolar spectrum subjects, including subthreshold categories in the São Paulo ECA study. *J Affect Disord.* 2005;87:231-41.

Murray C, Lopez A. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science.* 1996;274:740-3.

Nery FG, Stanley JA, Chen HH, Hatch JP, Nicoletti MA, Monkul ES, Lafer B, Soares JC. Bipolar disorder comorbid with alcoholism: a 1H magnetic resonance spectroscopy study. *J Psychiatr Res.* 2010;44:278-85.

Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:65-75.

Newcomer JW. Medical risk in patients with bipolar disorder and schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2006;67(Suppl 9):25-30.

Ng WX, Lau IY, Graham S, Sim K. Neurobiological evidence for thalamic, hippocampal and related glutamatergic abnormalities in bipolar disorder: a review and synthesis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33:336-54.

Noga JT, Vldar K, Torrey EF. A volumetric magnetic resonance imaging study of monozygotic twins discordant for bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2001;106:25-34.

Nugent AC, Milham MP, Bain EE, Mah L, Cannon DM, Marrett S, Zarate CA, Pine DS, Price JL, Drevets WC. Cortical abnormalities in bipolar disorder investigated with MRI and voxel-based morphometry. *Neuroimage*. 2006;30:485-97.

Ohara K, Isoda H, Suzuki Y, Takehara Y, Ochiai M, Takeda H, Igarashi Y, Ohara K. Proton magnetic resonance spectroscopy of the lenticular nuclei in bipolar I affective disorder. *Psychiatry Res*. 1998;84:55-60.

Olvera RL, Caetano SC, Fonseca M, Nicoletti M, Stanley JA, Chen HH, Hatch JP, Hunter K, Pliszka SR, Soares JC. Low levels of N-acetyl aspartate in the left dorsolateral prefrontal cortex of pediatric bipolar patients. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007;17:461-73.

Ongür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:13290-5.

Ongur D, Jensen JE, Prescott AP, Stork C, Lundy M, Cohen BM, Renshaw PF. Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glial interactions in acute mania. *Biol Psychiatry*. 2008;64:718-26.

Ongur D, Prescott AP, Jensen JE, Cohen BM, Renshaw PF. Creatine abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2009;172:44-8.

- Oquendo MA, Galfalvy H, Russo S, Ellis SP, Grunebaum MF, Burke A, Mann JJ. Prospective study of clinical predictors of suicidal acts after a major depressive episode in patients with major depressive disorder or bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2004; 161:1433-41.
- Osby U, Brandt L, Correia N, Ekbom A, Sparén P. Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;58:844-50.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12:913-22.
- Overall JE, Gorham DR. The Brief Psychiatric Rating Scale. *Psychol Rep*. 1962;10: 799-812.
- Palomino A, González-Pinto A, Aldama A, González-Gómez C, Mosquera F, González-García G, Matute C. Decreased levels of plasma glutamate in patients with first-episode schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res*. 2007;95:174-8.
- Patel NC, DelBello MP, Cecil KM, Stanford KE, Adler CM, Strakowski SM. Temporal change in N-acetyl-aspartate concentrations in adolescents with bipolar depression treated with lithium. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2008; 18:132-9.
- Pavuluri MN, O'Connor MM, Harral E, Sweeney JA. Affective neural circuitry during facial emotion processing in pediatric bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2007;62:158-67.
- Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, Lane R. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry*. 2003;54:504-14.
- Port JD, Unal SS, Mrazek DA, Marcus SM. Metabolic alterations in medication-free patients with bipolar disorder: a 3T CSF-corrected magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Psychiatry Res*. 2008;162:113-21.

- Post RM. Mechanisms of illness progression in the recurrent affective disorders. *Neurotox Res.* 2010;18:256-71.
- Pouwels PJ, Frahm J. Differential distribution of NAA and NAAG in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *NMR Biomed.* 1997;10:73-8.
- Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med.* 1993;30:672-9.
- Rahn KA, Slusher BS, Kaplin AI. Glutamate in CNS neurodegeneration and cognition and its regulation by GCPII inhibition. *Curr Med Chem.* 2012;19:1335-45.
- Rajkowska G. Cell pathology in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2002;4:105-16.
- Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2001;49:741-52.
- 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;121:109-22.
- Rao J, Ertley R, Rapoport S, Bazinet R, Lee H. Chronic NMDA administration to rats up-regulates frontal cortex cytosolic phospholipase A2 and its transcription factor, activator protein-2. *J Neurochem.* 2007;102:1918-27.
- Rihmer Z, Fawcett J. Suicide and bipolar disorder. In: Yatham LN, Maj M, editors. *Bipolar disorder – Clinical and neurobiological foundations*. Oxford: Willey-Blackwell; 2010. Chap. 7, p.62-8.
- Rosa A, Reinares M, Michalak E, Bonnin C, Sole B, Franco C, Comes M, Torrent C, Kapczinski F, Vieta E. Functional Impairment and Disability across Mood States in Bipolar Disorder. *Value Health.* 2010;13:984-8.

- Rosa AR, González-Ortega I, González-Pinto A, Echeburúa E, Comes M, Martínez-Àran A, Ugarte A, Fernández M, Vieta E. One-year psychosocial functioning in patients in the early vs. late stage of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 2012;125:335-41.
- Roy-Byrne P, Post RM, Uhde TW, Porcu T, Davis D. The longitudinal course of recurrent affective illness: life chart data from research patients at the NIMH. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1985;317:1-34.
- Sakai T, Oshima A, Nozaki Y, Ida I, Haga C, Akiyama H, Nakazato Y, Mikuni M. Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology*. 2008;28:143-50.
- Salibi N, Brown MA. *Clinical MR spectroscopy. First principles*. New York: Wiley-Liss; 1998.
- Sanacora G, Kendell SF, Levin Y, Simen AA, Fenton LR, Coric V, Krystal JH. Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms. *Biol Psychiatry*. 2007;61:822-5.
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:426-37.
- Sarramea Crespo F, Luque R, Prieto D, Sau P, Albert C, Leal I, de Luxan A, Osuna MI, Ruiz M, Galán R, Cabaleiro F, Molina V. Biochemical changes in the cingulum in patients with schizophrenia and chronic bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2008;258:394-401.
- 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;162:2109-15.

Scherk H, Backens M, Schneider-Axmann T, Kemmer C, Usher J, Reith W, Falkai P, Gruber O. Neurochemical pathology in hippocampus in euthymic patients with bipolar I disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 2008;117:283-8.

Scherk H, Backens M, Schneider-Axmann T, Usher J, Kemmer C, Reith W, Falkai P, Gruber O. Cortical neurochemistry in euthymic patients with bipolar I disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2009;10:285-94.

Schloesser R, Huang J, Klein P, Manji H. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:110-33.

Schloesser RJ, Manji HK, Martinowich K. Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport*. 2009;20:553-7.

Schloesser RJ, Martinowich K, Manji HK. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends Neurosci*. 2012;35:36-46.

Schweinsburg BC, Taylor MJ, Videen JS, Alhassoon OM, Patterson TL, Grant I. Elevated myo-inositol in gray matter of recently detoxified but not long-term abstinent alcoholics: a preliminary MR spectroscopy study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24:699-705.

Scott J, Paykel E, Morriss R, Bentall R, Kinderman P, Johnson T, Abbott R, Hayhurst H. Cognitive-behavioural therapy for severe and recurrent bipolar disorders: randomised controlled trial. *Br J Psychiatry*. 2006;188:313-20.

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 A, MacQueen G, Hall G. 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;172:205-9.

Shahana N, Delbello M, Chu WJ, Jarvis K, Fleck D, Welge J, Strakowski S, Adler C. Neurochemical alteration in the caudate: implications for the pathophysiology of bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2011;193:107-12.

Sharma R, Venkatasubramanian PN, Bárány M, Davis JM. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in schizophrenic and affective patients. *Schizophr Res.* 1992;8:43-9.

Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, Hergueta T, Baker R, Dunbar GC. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): The development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry.* 1998;59(Suppl. 20):22-33.

Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Lazzarino G, Beaumont A, Vagnozzi R. N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2001;18:977-91.

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;17:321-7.

Silverstone PH, Wu RH, O'Donnell T, Ulrich M, Asghar SJ, Hanstock CC. Chronic treatment with lithium, but not sodium valproate, increases cortical N-acetyl-aspartate concentrations in euthymic bipolar patients. *Int Clin Psychopharmacol.* 2003;18:73-9.

Singh M, Spielman D, Adleman N, Alegria D, Howe M, Reiss A, Chang K. Brain glutamatergic characteristics of pediatric offspring of parents with bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2010;182:165-71.

Srivastava S, Ketter TA. Clinical relevance of treatments for acute bipolar disorder: balancing therapeutic and adverse effects. *Clin Ther.* 2011;33:40-8.

Stanley JA. In vivo magnetic resonance spectroscopy and its application to neuropsychiatric disorders. *Can J Psychiatry.* 2002;47:315-26.

Stark C. Functional Role of the Human Hippocampus. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press; 2007. Chap. 12, p.549-79.

Stoll AL, Renshaw PF, Sachs GS, Guimaraes AR, Miller C, Cohen BM, Lafer B, Gonzalez RG. The human brain resonance of choline-containing compounds is similar in patients receiving lithium treatment and controls: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry*. 1992;32:944-9.

Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry*. 2005;10:900-19.

Strakowski SM, Adler CM, Almeida J, Altshuler LL, Blumberg HP, Chang KD, DelBello MP, Frangou S, McIntosh A, Phillips ML, Sussman JE, Townsend JD. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar Disord*. 2012;14:313-25.

Strakowski SM, DelBello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder. A review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry*. 2005;10:105-16.

Strakowski SM, DelBello MP, Sax KW, Zimmerman ME, Shear PK, Hawkins JM, Larson ER. Brain magnetic resonance imaging of structural abnormalities in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1999; 56: 254-60.

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;159:1841-7.

Strakowski SM, Wilson DR, Tohen M, Woods BT, Douglass AW, Stoll AL. Structural brain abnormalities in first-episode mania. *Biol Psychiatry*. 1993;33:602-9.

Strawn JR, Patel NC, Chu WJ, Lee JH, Adler CM, Kim MJ, Bryan HS, Alfieri DC, Welge JA, Blom TJ, Nandagopal JJ, Strakowski SM, DelBello MP. Glutamatergic effects of divalproex in adolescents with mania: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012;51:642-51.

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.

Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*. 2011;16:1177-88.

Tohen M, Hennen J, Zarate CJ, Baldessarini R, Strakowski S, Stoll A, Faedda GL, Suppes T, Gebre-Medhin P, Cohen BM. Two-year syndromal and functional recovery in 219 cases of first-episode major affective disorder with psychotic features. *Am J Psychiatry*. 2000;157:220-8.

Tohen M, Vieta E, Gonzalez-Pinto A, Reed C, Lin D; European Mania in Bipolar Longitudinal Evaluation of Medication (EMBLEM) Advisory Board. Baseline characteristics and outcomes in patients with first episode or multiple episodes of acute mania. *J Clin Psychiatry*. 2010;71:255-61.

Tondo L, Isacson G, Baldessarini R. Suicidal behaviour in bipolar disorder: risk and prevention. *CNS Drugs*. 2003;17:491-511.

Toniolo RA, Caetano SC, da Silva PV, Lafer B. Clinical significance of lifetime panic disorder in the course of bipolar disorder type I. *Compr Psychiatry*. 2009;50:9-12.

Torres I, DeFreitas V, DeFreitas C, Kauer-Sant'Anna M, Bond D, Honer W, Lam RW, Yatham LN. Neurocognitive functioning in patients with bipolar I disorder recently recovered from a first manic episode. *J Clin Psychiatry*. 2010;71:1234-42.

Tseng WP, Lin-Shiau SY. Long-term lithium treatment prevents neurotoxic effects of beta-bungarotoxin in primary cultured neurons. *J Neurosci Res*. 2002;69:633-41.

Uranova N, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: the study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophrenia Res*. 2004;67:269-75.

Valentin, A, Garcia-Seoane JJ, Colino A. Lithium enhances synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *Neuroscience*. 1997;78, 385-91.

van der Knaap MS, van der Grond J, van Rijen PC, Faber JA, Valk J, Willemsse K. Age-dependent changes in localized proton and phosphorus MR spectroscopy of the brain. *Radiology*. 1990;176:509-15.

van Gorp WG, Altshuler L, Theberge DC, Wilkins J, Dixon W. Cognitive impairment in euthymic bipolar patients with and without prior alcohol dependence. A preliminary study. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55:41-6.

Vawter MP, Tomita H, Meng F, Bolstad B, Li J, Evans S, Choudary P, Atz M, Shao L, Neal C, Walsh DM, Burmeister M, Speed T, Myers R, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney WE. Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonist-pH state: implications for brain disorders. *Mol Psychiatry*. 2006;11:615:663-79.

Videbech P. MRI findings in patients with affective disorder: a meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 1997;96:157-68.

Vostrikov VM, Uranova N, Orlovskaya DD. Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophrenia Res*. 2007;94: 273-80.

Wang J, Shao L, Sun X, Young L. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord*. 2009;11: 523-9.

Wang JF, Azzam JE, Young LT. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience*. 2003;116:485-9.

Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD. Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation. *Mol Psychiatry*. 2008;13:285-92.

Williams JBW, Link MJ, Rosenthal NE, Terman M. *Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale, Seasonal Affective Disorders Version (SIGH-SAD)*. New York: New York State Psychiatric Institute; 1988.

Williams RS, Cheng L, Mudge AW, Harwood AJ. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*. 2002;417:292-5.

Winsberg ME, Sachs N, Tate DL, Adalsteinsson E, Spielman D, Ketter TA. Decreased dorsolateral prefrontal N-acetyl aspartate in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2000;47:475-81.

Woo TU, Walsh JP, Benes FM. Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:649-57.

Wu RH, O'Donnell T, Ulrich M, Asghar SJ, Hanstock CC, Silverstone PH. Brain choline concentrations may not be altered in euthymic bipolar disorder patients chronically treated with either lithium or sodium valproate. *Ann Gen Hosp Psychiatry*. 2004;3:13.

Yoon SJ, Lyoo IK, Haws C, Kim TS, Cohen BM, Renshaw PF. Decreased glutamate/glutamine levels may mediate cytidine's efficacy in treating bipolar depression: a longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy study. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34:1810-8.

Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry*. 1978;133:429-35.

Yucel K, McKinnon MC, Taylor VH, Macdonald K, Alda M, Young LT, MacQueen GM. Bilateral hippocampal volume increases after long-term lithium treatment in patients with bipolar disorder: a longitudinal MRI study. *Psychopharmacology*. 2007;195:357-67.

Zarate CJ, Singh J, Manji H. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2006;59:1006-20.

Zubieta JK, Huguelet P, O'Neil RL, Giordani BJ. Cognitive function in euthymic bipolar I disorder. *Psychiatry Res*. 2001;102:9-20.