HELENA PASSARELLI GIROUD JOAQUIM

**Serotonina e glicogênio sintase quinase 3B em plaqueta de
pacientes idosos com transtorno depressivo maior: efeito do
tratamento com sertralina**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

São Paulo

2012

HELENA PASSARELLI GIROUD JOAQUIM

**Serotonina e glicogênio sintase quinase 3B em plaqueta de
pacientes idosos com transtorno depressivo maior: efeito do
tratamento com sertralina**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Joaquim, Helena Passarelli Giroud

Serotonina e glicogênio sintase quinase 3B em plaqueta de pacientes idosos com transtorno depressivo maior : efeito do tratamento com sertralina / Helena Passarelli Giroud Joaquim. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Psiquiatria.

Orientador: Wagner Farid Gattaz.

Descritores: 1.Quinase 3 glicogênio sintase 2.Transtorno depressivo maior 3.Sertralina 4.Serotonina 5.Plaquetas

USP/FM/DBD-001/12

Nome: Joaquim, Helena Passarelli Giroud

Título: Serotonina e glicogênio sintase quinase 3B em plaqueta de pacientes idosos com transtorno depressivo maior: efeito do tratamento com sertralina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição:.....Assinatura.....

Prof. Dr. _____

Instituição:.....Assinatura.....

Prof. Dr. _____

Instituição:.....Assinatura.....

À minha mãe Cássia.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Wagner F. Gattaz, meu orientador, pela oportunidade, discussões, atenção e apoio e incentivo durante o período de trabalho.

À Leda Leme Talib, minha co-orientadora extra-oficial, professora e amiga, pela paciência, confiança e todos os ensinamentos.

Aos colegas do LIM-27 pela convivência.

Ao Dr. Breno pela avaliação clínica dos pacientes, controle da casuística e discussões durante o trabalho. Ao Dr. Orestes pela colaboração e prestatividade.

Aos amigos Carolina, Daniel e Vanessa, que me incentivaram a cada discussão, obrigada pela companhia, pelo apoio e por todos os momentos felizes e de descontração.

À Zelinda pelo auxílio burocrático e ajuda sempre que necessária. À D. Edivani pelos cafezinhos e pela limpeza dos materiais, essenciais para a continuidade do trabalho.

À minha mãe Cássia, minha inspiração e meu exemplo, na pesquisa e na vida. Aos meus irmãos, Gustavo e Daniel e ao meu padasto Ubiratan pelo apoio e incentivo incondicional. À Marília por seu apoio e risadas.

Ao meu pai Eduardo por despertar o gosto à atividade acadêmica.

Aos meus avós, Edward, Liliane e Maria pelo apoio e torcida desde o começo.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Luis pelo interesse, apoio, compreensão, horas de conversa e incentivo sempre.

Aos meus amigos Maria Cláudia, Nathália, Pedro, Henrique e Karen, que sempre estiveram prontos para me ajudar e compreenderam minha ausência em virtude da minha dedicação à pesquisa.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS) pelo apoio financeiro à pesquisa do LIM-27.

“Se você faz algo de bom e tudo dá certo, acho que é hora de pensar em outra coisa e tentar adivinhar o que vem pela frente.”

Steve Jobs

Joaquim HPG (2012). *Serotonina e glicogênio sintase quinase 3B em plaqueta de pacientes idosos com transtorno depressivo maior: efeito do tratamento com sertralina [dissertação]*. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Resumo

A depressão é o mais comum dos distúrbios afetivos. Afeta ao menos 10% da população idosa do Brasil. Nos idosos, alguns fatores ligados ao metabolismo parecem estar bastante relacionados a esse transtorno, como uma menor concentração de noradrenalina e serotonina (5-HT) e uma maior atividade da monoaminoxidase em relação a adultos jovens. Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), principalmente a sertralina, são a primeira opção no tratamento da fase aguda e manutenção dos episódios depressivos em idosos. As plaquetas vêm sendo amplamente utilizadas como modelo para estudar na periferia alterações que ocorrem no sistema nervoso central. A 5-HT apesar de ser primordialmente expressa no cérebro, também pode ser encontrada em plaquetas. Este neurotransmissor está envolvido em inúmeros aspectos do funcionamento normal do cérebro desde a regulação do humor até a regulação hormonal. A deficiência nos níveis de 5-HT pode estar intimamente ligada a alguma anormalidade na atividade da glicogênio sintase quinase 3B(GSK3B). Esta enzima exerce funções no metabolismo celular que vão desde sobrevivência celular, metabolismo e processamento de proteínas, até processos cognitivos. A atividade da GSK3B é estreitamente regulada pela fosforilação. Fosforilação no sítio ser9 inativa a enzima, enquanto que a desfosforilação neste mesmo sítio ativa a enzima. Diversos estudos têm mostrado que a forma inativa da enzima exerce um efeito neuroprotetor. O objetivo do presente estudo foi verificar a influência do tratamento com sertralina, em pacientes idosos com diagnóstico de depressão maior, sobre a 5-HT e GSK3B após 3 e 12 meses de tratamento. A quantificação da 5-HT foi

realizada por HPLC e da GSK3B plaquetária, pelos métodos de ELISA e blotting, que se revelaram equivalentes. Após um ano de tratamento encontramos uma diminuição da 5-HT plaquetária nos pacientes com depressão maior com relação aos níveis basais, bem como um aumento da forma total da enzima GSK3B (GSKT), uma diminuição da forma fosforilada (pGSK) e da razão entre pGSK e GSKT (rGSK). Quando comparados os níveis de GSK3B de pacientes tratados por um ano e controles, observamos uma maior expressão de GSKT em pacientes; enquanto a pGSK e rGSK se mostraram equivalentes. Pudemos observar, portanto, uma modulação da 5-HT e da GSK3B pelo uso de sertralina. Essa modulação pode indicar que a ação antidepressiva deste fármaco pode estar associada a essas vias de sinalização.

Palavras chaves: glicogênio sintase quinase 3; serotonina; plaquetas; sertralina; transtorno depressivo maior.

Joaquim HPG. *Serotonin and glycogen synthase kinase 3B in platelets of elderly patients with major depressive disorder: Sertraline effects [dissertation]*. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Summary

Depression is the most common affective disorders. It affects at least 10% of the elderly population of Brazil. In the elderly, some factors related to metabolism appear to be closely related to this disorder, such as lower concentration of noradrenaline and serotonin (5-HT) and increased monoamine oxidase activity in relation to young adults. The selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), especially sertraline are the first choice in treating acute and maintenance of depressive episodes in the elderly. Platelets have been widely used as a model to study in peripheral changes that occur in Central Nervous System. Although 5-HT is primarily expressed in the brain, it can also be found in platelets. This neurotransmitter is involved in numerous aspects of normal brain function since the regulation of mood to the hormonal regulation. A deficiency in 5-HT levels may be closely related to an abnormality in glycogen synthase kinase 3B (GSK3B) activity. This enzyme plays several functions in cell metabolism, ranging from cell survival, metabolism and protein processing, to cognitive processes. The GSK3B activity is tightly regulated by phosphorylation. Phosphorylation on Ser9 site inactivates the enzyme, whereas dephosphorylation in the same site activates the enzyme. Several studies have shown that the inactive form of the enzyme plays a neuroprotective effect.

The objective of this study was to investigate the influence of sertraline in elderly patients diagnosed with major depression, on platelet 5-HT and GSK3B after 3 and 12 months of treatment. Quantification of 5-HT was performed by HPLC and GSK3B by ELISA and western blotting. The methods for platelet GSK3B determination showed to be equivalent.

After one year of treatment we found a decrease of platelet 5-HT in patients with major depression relative to their baseline levels, as well as an increase in the total form of GSK3B enzyme (GSKT), a decrease in phosphorylated form (pGSK) and the ratio between pGSK and GSKT (rGSK). Comparing the levels of GSK3B of patients with one year of treatment and controls, we found a higher GSKT expression in patients; while pGSK and rGSK showed to be equivalent. Therefore we observed a modulation of 5-HT and GSK3B by sertraline. This modulation may indicate that the antidepressant action of this drug may be associated with these signaling pathways.

Keywords: glycogen synthase kinase 3, serotonin, platelets, sertraline, major depressive disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de desistência de pacientes ao decorrer do tratamento e amostras disponíveis para análise em cada etapa.	44
Figura 2 - Cromatogramas de diferentes pontos da curva de calibração	49
Figura 3 - Comparação de concentração de 5-HT por plaquetas nas diferentes visitas.	55
Figura 4 - Comparação da enzima GSKT nas três visitas e grupo controle..	57
Figura 5 - Comparação da enzima pGSK nas três visitas e grupo controle..	58
Figura 6 - Comparação da rGSK nas três visitas e grupo controle	58
Figura 7 - Correlação entre pGSK e 5-HT na visita 1.	59
Figura 8 - Blot para a enzima GSKT.	82
Figura 9 - Blot para a enzima pGSK.	83
Figura 10 - Comparação da enzima GSKT e da enzima pGSK por blotting	84
Figura 11 - Comparação da rGSK por blotting nas 3 visitas.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição da amostra e distribuição dos indivíduos envolvidos no estudo.....	45
Tabela 2 - Primeiro gradiente testado: fluxo e concentração das bombas de acordo com o tempo de corrida.	47
Tabela 3 - Segundo gradiente testado: concentração das bombas de acordo com o tempo de corrida.....	47
Tabela 4 - Médias e desvios padrão da concentração de 5-HT nas diferentes visitas.	56
Tabela 5 - Médias e desvios padrão de GSKT, pGSK e rGSK nas visitas 1, 2, 3 e controles. ..	57
Tabela 6 - Correlações entre 5-HT e GSKT, 5-HT e pGSK, 5-HT e rGSK nas visitas 1, 2 e 3. .	59
Tabela 7 - Testes feitos para revelação da GSKT.....	79
Tabela 8 - Testes feitos para revelação da pGSK.	80
Tabela 9 - Médias e desvios padrão de GSKT, pGSK e rGSK nas visitas 1, 2 e 3.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTP - 5-hidroxitriptofano
5HT1-7 – receptores de serotonina dos grupos 1 a 7
A β - peptídeos β -amilóide
ADT - antidepressivos tricíclicos
AIRSs - antagonistas/inibidores de 5-HT
Akt - proteína quinase B, PKB
APP - proteína precursora do amiloide
AVC - acidente vascular cerebral
BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*
CID-10 - Classificação Internacional de Doenças
CREB - *cAMP response element-binding*
DA - doença de Alzheimer
DISNs - desinibidores da 5-HT e noradrenalina
DSM-IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
ELISA - *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*
FHP - filamentos helicoidais pareados
GSK3 - glicogênio sintase quinase 3
GSK3A - glicogênio sintase quinase 3 alfa
Gsk3B - gene da glicogênio sintase quinase 3 B de rato
GSK3B - glicogênio sintase quinase 3 beta
GSKT - glicogênio sintase quinase 3 beta total
HPLC - (*high performance liquid chromatography*) Cromatografia líquida de alta eficiência
pGSK - glicogênio sintase quinase 3 beta fosforilada no sítio serina 9
IMAO - inibidores da monoaminoxidase
IRNs - inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina
IRNDs - inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina
IRSns - inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina
ISRSs - inibidores seletivos da recaptação de serotonina
mRNA - RNA mensageiro
OMS - Organização Mundial da Saúde
Pi - padrão interno
PKA - proteína quinase A
PKB - proteína quinase B, Akt

PKC - proteína quinase C
PRP - plasma rico em plaquetas
rGSK - razão de GSK3B pGSK/GSKT
Ser9 - Serina 9
SERT - transportador de serotonina
SNC - sistema nervoso central
TAB - transtorno afetivo bipolar
Tph2 - triptofano hidroxilase-2
Tyr216 - tirosina 216

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Depressão	18
1.1.1 Depressão em idosos	20
1.1.2 Fisiopatologia.....	22
1.2 Tratamento farmacológico	24
1.2.1 Tipos de antidepressivos	24
1.3 Serotonina e receptores.....	27
1.4 Glicogênio sintase quinase-3	29
1.4.1 Bioquímica da GSK3.....	30
1.4.2 Patologias relacionadas à GSK3B	32
1.4.2.1 Transtornos neuropsiquiátricos	33
1.5 GSK3, 5-HT e depressão.....	36
1.6 Plaquetas.....	38
1.7 Sertralina	39
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Casuística.....	41
3.1.1 Caracterização clínica.....	41
3.1.2 Amostra recrutada	43
3.2 Métodos de análise das amostras.....	45
3.2.1 Determinação da 5-HT	46
3.2.1.1 Obtenção de PRP	46
3.2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	46
3.2.1.3 Validação do método de HPLC	48
3.2.2 Determinação da GSK3B.....	50
3.2.2.1 Obtenção e preparo das plaquetas	51
3.2.2.2 Determinação de proteína das amostras	53
3.3 Análises estatísticas.....	53
4 RESULTADOS	55

4.1 Quantificação da 5-HT	55
4.2 Quantificação da GSK3B	56
4.3 Correlação entre 5-HT e GSK3B.....	59
4.4 Correlação de dados clínicos e GSK3B	60
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A – Soluções utilizadas	75
ANEXO B – Padronização de <i>western blotting</i> e <i>immunoblotting</i>	77
APÊNDICE A – Aprovação do Comitê de Ética	85
APÊNDICE B – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a depressão é um “distúrbio mental comum caracterizado por humor depressivo, perda de interesse e prazer, sentimentos de culpa ou baixa autoestima, distúrbio de sono ou apetite, baixa energia e baixa concentração” (www.who.int).

Os quadros depressivos se dividem em: distímia, depressão subsindrômica e depressão maior. A distímia é uma forma de depressão crônica, não-episódica, de sintomatologia menos intensa do que as chamadas depressões maiores (Griffiths et al., 2000; Akiskal, 2001). Depressão subsindrômica é o mesmo que depressão menor caracterizada por quadros nos quais há a presença de sintomas depressivos significativos que interferem na qualidade de vida e na capacidade funcional do paciente, mas não preenchem critérios suficientes para outros diagnósticos via DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*).

A depressão maior é uma condição depressiva principal que pode ser subdividida em múltiplos grupos, levando-se em consideração a categorização (p.e. psicóticas, catatônicas, melancólicas); a etiologia (p.e. pós-parto, sazonal) e ainda de forma dimensional (envolvendo gravidade, cronicidade e persistência). A definição de depressão maior não é pontual, visto que abrange quadros tão diferentes entre si. De acordo com o DSM-IV a depressão maior

requer ao menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse/prazer em quase todas as atividades; quatro ou mais sintomas de uma lista que inclui alterações de apetite, peso, sono, características psicomotoras, sentimentos de inutilidade ou culpa descabidos, dificuldade de pensar, de concentrar-se e tomar decisões, pensamentos ou ideias recorrentes de morte, planos ou tentativas suicidas. Estes sintomas citados devem ter surgido ou piorado recentemente e devem persistir durante a maior parte do dia, quase todos os dias, por duas semanas consecutivas. Além disso, os sintomas devem causar sofrimento ou prejuízo, clinicamente significativos, nas áreas social e ocupacional. É importante que os sintomas não tenham sido causados por situação de luto, alguma condição clínica primária ou abuso de quaisquer substâncias (*American Psychiatry Association*, 1994).

As diferenças encontradas na prevalência da depressão nos principais estudos disponíveis refletem, sobretudo, a falta de metodologia comum. Dependendo do país e das entrevistas aplicadas, as prevalências durante a vida na população geral variaram de 4,9% a 17,1% para a depressão maior e de 3,2% a 6,3% para a distímia (Angst et al., 2003).

Estudos específicos com idosos indicam que para esse grupo as taxas de prevalência da depressão diferem dependendo do critério diagnóstico e da população estudada. Em pacientes institucionalizados intactos cognitivamente a prevalência é cerca de 60%; nos pacientes com doenças crônicas hospitalizados ou em unidades de atenção primária cerca de 25%; e nos residentes na comunidade cerca de 10% (Barua et al., 2011; Pinho et al., 2011).

Estudos longitudinais apontam para 7 a 30% de evolução para curso crônico, ou até 40%, se forem consideradas as remissões parciais (Alexopoulos e Chester, 1992). Pesquisas realizadas no Brasil apontaram uma prevalência de depressão em idosos 14,3% em São Paulo (Forlenza, 2007).

1.1.1 Depressão em idosos

São inúmeros os fatores que tornam os idosos um grupo com maior risco de desenvolvimento de algum tipo de transtorno do humor, porém ainda não há nenhuma teoria que explique satisfatoriamente sua etiologia (Forlenza e Almeida, 1997). Os fatores genéticos estão presentes, mas contribuem menos do que no caso da depressão de início precoce. Considerando a hipótese do déficit de monoaminas, fatores ligados ao metabolismo parecem estar relacionados, já que as concentrações de noradrenalina e serotonina (5-HT) diminuem e a atividade da monoaminoxidase aumenta com a idade. Além de alterações hormonais e desregulação do ritmo circadiano que também podem estar envolvidas. Paralelamente aos aspectos biológicos, os aspectos sociais também modulam o desenvolvimento de quadros depressivos: idosos envolvidos em atividades sociais e que têm vínculos afetivos com amigos e parentes têm menor risco de desenvolver estes quadros (Blazer e Koenig, 1996).

Nos idosos a depressão provoca inúmeros sintomas clínicos e queixas somáticas, aumenta o risco de morte por causas médicas, interfere negativamente na morbidade por doenças físicas e aumenta a incapacidade e dependência (Forlenza, 2007). Além disso, quadros depressivos têm sido frequentemente associados à demência. Não se sabe exatamente qual a relação entre os eventos, se de causa ou consequência, mas já há alguns estudos que buscam elucidar. Há evidências crescentes de que a depressão é um fator de risco para a demência, inclusive aumentando as chances de doença de Alzheimer (DA) ou demência vascular. Há grupos que acreditam que a depressão é uma síndrome pré-demencial ou até mesmo um sinal de declínio cognitivo. E ainda há os que acreditam que a depressão é apenas uma reação ao diagnóstico de declínio cognitivo. O que se sabe é que fatores de risco genéticos, vasculares ou até mesmo ambientais são comuns às duas condições (revisado em Mulyala e Varghese, 2010).

A apresentação dos quadros depressivos nos idosos é mais heterogênea que nos indivíduos jovens, o que torna o seu diagnóstico mais difícil na prática clínica. Podemos citar: tendência a expressar os sintomas como queixas físicas, resistência em relatar sintomas psiquiátricos e/ou considerar os sintomas depressivos naturais da velhice, por exemplo (Draper e Koschera, 2001). Apesar disso, os critérios diagnósticos para as síndromes depressivas nos idosos são os mesmos usados para a avaliação dos quadros depressivos nos pacientes mais jovens, como por exemplo, os descritos no DSM-IV. Para auxiliar no diagnóstico há também a escala de depressão

geriátrica (GDS) para rastreamento dos transtornos de humor em idosos, que ajuda na identificação de quadros depressivos e a diferenciação de quadros pré-demenciais.

1.1.2 Fisiopatologia

A hipótese das monoaminas, proposta em 1965 por Schildkraut, constitui a principal teoria bioquímica para a depressão. Essa hipótese estabelece que um déficit funcional das monoaminas transmissoras em determinadas localidades cerebrais causa a depressão, enquanto um excesso na função resulta no estado maníaco (Middlemiss et al., 2002; Jope e Roh, 2007). A hipótese das monoaminas surgiu, principalmente, das tentativas e erros na prescrição de fármacos com posterior análise dos efeitos e resultados (Hall et al., 2002; Rang et al., 2003).

Muitas evidências acumularam-se sugerindo que a depressão pode ser causada pela diminuição da disponibilidade de norepinefrina e/ou serotonina (5-HT) no cérebro (Hall et al., 2002). Essa diminuição da disponibilidade depende de alguns fatores: síntese diminuída ou degradação precoce de neurotransmissores; alterações na expressão ou função dos receptores e prejuízo dos sinais pós-sinápticos (Urani et al., 2005). A principal razão para se acreditar que a depressão seja causada pela atividade diminuída dos sistemas de norepinefrina e 5-HT é que os fármacos que bloqueiam a secreção desses

neurotransmissores causam quadros depressivos. Ao contrário, aproximadamente 70% dos pacientes com diagnóstico de depressão podem ser efetivamente tratados com, por exemplo: inibidores de monoaminoxidases, que bloqueiam a degradação da norepinefrina e da 5-HT; antidepressivos tricíclicos, que bloqueiam a recaptação da norepinefrina e da 5-HT pelas terminações nervosas; e fármacos que aumentam a ação da 5-HT e podem ter efeitos colaterais menores: os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) (Rang et al., 2003).

Apesar dos diversos estudos focados em identificar a fisiopatologia da depressão, os resultados ainda são divergentes e inconsistentes. A relação com o sistema monoaminérgico é indiscutível, porém atualmente têm-se estudado o sistema de receptores, mais do que o sistema de síntese ou recaptação das monoaminas. Além disso, têm-se estudado também os eventos moleculares desencadeados por esses receptores específicos, incluindo a regulação da expressão dos genes (Stahl, 2010). Algumas vias intracelulares estão sendo investigadas, mas as duas que parecem estar mais relacionadas com a ação de antidepressivos são: via da adenilato ciclase (mais conhecida por ser a via do BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) e a via do fosfotidilinositol.

Na via da adenilato ciclase receptores ligados à proteína G quando estimulados, desencadeiam a fosforilação de proteínas e fatores de transcrição pela proteína quinase A (PKA). Um desses fatores de transcrição é o CREB que ativado aumenta a expressão do gene BDNF e seu receptor específico (revisado em Fisar e Hroudová, 2010). BDNF é um fator neurotrófico que está

associado à viabilidade e à plasticidade neuronal. Em situações de *stress* o gene é reprimido, ocasionando atrofia e até apoptose dos neurônios hipocampais. A ideia é que essa sequência de acontecimentos provoca os sintomas depressivos e que a regulação dessa via pelos antidepressivos restaura a neuroplasticidade (Lee e Kim, 2010).

A via do fosfatidilinositol envolve a ativação da fosfolipase C que catalisa a produção de diacilglicerol. Este permite a ativação da proteína quinase C (PKC) que, entre outras funções, fosforila a glicogênio sintase quinase 3B (GSK3B) inativando-a (revisado em Fisar e Hroudová, 2010).

1.2 Tratamento farmacológico

1.2.1 Tipos de antidepressivos

Os antidepressivos podem ser classificados em: tricíclicos (ADTs), inibidores da monoaminoxidase, antagonistas/inibidores de 5-HT (AIRSs), desinibidores da 5-HT e noradrenalina (DISNs), inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (IRNs), inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina (IRNDs), inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSNs) e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (Stahl, 2010).

Atualmente os ISRSs são os fármacos mais prescritos para tratamento da fase aguda e manutenção de quadros de depressão maior em idosos. Antes

do desenvolvimento dos ISRSs, os ADTs eram bastante utilizados. Apesar de serem geralmente eficazes quando usados em dose e tempo adequados, os ADTs têm um perfil de efeitos colaterais e risco de toxicidade cardiovascular que os tornam uma opção menos vantajosa para esse grupo de pacientes (Forlenza et al., 2000). A preferência pela prescrição dos ISRSs se dá devido ao seu perfil seguro em relação a efeitos colaterais, principalmente os de menor meia-vida (Scalco, 2002), especialmente a paroxetina e a sertralina (Stella et al., 2002).

Os fármacos que inibem a recaptação de 5-HT têm como vantagem a maior afinidade por transportadores de 5-HT em relação aos de noradrenalina e por isso causam menos efeitos colaterais anticolinérgicos (Licínio e Wong, 2005). Os principais representantes dessa classe de fármacos são: fluvoxamina, sertralina, paroxetina, citalopram, escitalopram e fluoxetina. A sertralina é eficiente para a depressão grave e distímia. Quanto ao tratamento da depressão nos idosos foi tida como tendo uma eficácia superior à do placebo e comparável a outro inibidor seletivo de recaptação de 5-HT, a fluoxetina, e aos tricíclicos: amitriptilina, nortriptilina e imipramina. (revisado em Forlenza et al., 2000).

Os ISRSs inibem a recaptação pelo neurônio pré-sináptico ao se ligarem ao transportador de 5-HT (SERT), aumentando o nível de 5-HT disponível para se ligar ao receptor pós-sináptico. Porém, alguns estudos mostraram que os eventos que ocorrem na extremidade somatodendrítica do neurônio serotonérgico podem ser mais importantes para explicação das ações

terapêuticas dos ISRSs. Apesar de terem o mesmo mecanismo de ação, os ISRSs são estruturalmente distintos com marcadas diferenças no perfil farmacodinâmico e farmacocinético. A potência da inibição de recaptação da 5-HT é variada, assim como a seletividade por noradrenalina e dopamina (Stahl, 2010).

Quando se administra um ISRS, o bloqueio agudo do SERT eleva a concentração de 5-HT na fenda sináptica. Esse aumento ocorre primeiro na área somatodendrítica do neurônio serotoninérgico, onde há receptores 5HT1A. Esse aumento parece ser o responsável não pelas ações terapêuticas da medicação, mas pelos efeitos colaterais. Com o tempo, o aumento dos níveis de 5-HT nos auto-receptores 5-HT1A fazem com que eles se sub-regulem e fiquem dessensibilizados. Quando ocorre esta dessensibilização, a 5HT não pode mais desativar efetivamente sua própria liberação. Assim, há um aumento na liberação de 5-HT pelos axônios e o consequente aumento no fluxo de impulsos neuronais. Neste momento iniciam-se as ações terapêuticas dos ISRSs. Com o acúmulo da serotonina nas sinapses os receptores pós-sinápticos também são dessensibilizados. O tempo necessário para essa dessensibilização se correlaciona com o aparecimento da tolerância aos efeitos colaterais dos ISRSs (Stahl, 2010).

Os ISRSs, em geral, são rapidamente absorvidos, menos afetados pelo metabolismo de primeira passagem e se ligam fortemente às proteínas plasmáticas (podendo então deslocar outras drogas e aumentar sua concentração no plasma). Além disso, por serem primariamente metabolizados

no fígado pelas enzimas do citocromo P450, podem alterar acentuadamente o metabolismo de outras drogas, sendo necessário maior cuidado ao se administrar outros medicamentos simultaneamente (Moreno et al., 1999).

No tratamento farmacológico dos transtornos depressivos nos idosos, o clínico deve ter em mente as modificações farmacocinéticas e farmacodinâmicas associadas ao envelhecimento. Idosos têm maior risco de apresentar efeitos colaterais, apresentam maior sensibilidade aos efeitos adversos e tem maiores riscos de sofrer com as diversas possibilidades de interações medicamentosas (Burke e Preskorn, 1995).

1.3 Serotonina e receptores

A 5-HT é um neurotransmissor e sua principal função é estabelecer uma comunicação entre os neurônios. Esta comunicação é fundamental para a percepção e avaliação do meio, permitindo ao ser humano responder a estímulos ambientais. A 5-HT está envolvida em inúmeros aspectos do funcionamento normal do cérebro desde a regulação do humor até a regulação hormonal (Yatham e Steiner, 1993) e relações sociais.

Baseados nessas observações, inúmeros estudos relacionam a 5-HT e seu desequilíbrio no sistema nervoso com condições psiquiátricas. Além disso, drogas que controlam os níveis de 5-HT são utilizadas frequentemente para o

tratamento dessas condições (Beaulieu et al., 2008). A 5-HT está em maior concentração no cérebro (Peineau et al., 2008), mas também pode ser encontrada em plaquetas – nos grânulos densos - as quais podem ser estudadas como indicador da função 5-HT central (Johnson et al., 2003).

A 5-HT é sintetizada a partir do triptofano, um aminoácido derivado da proteína da dieta, cujo nível plasmático varia de modo considerável de acordo com a ingestão de alimentos e com o ciclo circadiano (Rang et al., 2003). O triptofano é ativamente captado pelos neurônios, convertido pela triptofano hidroxilase-2 (Tph2) em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) que, quando descarboxilado, forma a 5-hidroxitriptamina, mais conhecida como 5-HT (Owens et al., 1998; Beaulieu et al., 2008).

Os receptores serotoninérgicos são acoplados à proteína G – com exceção do 5-HT₃ – e são divididos em sete grupos (5-HT₁₋₇) e alguns subgrupos, levando-se em consideração dados de sequências de aminoácidos obtidos de clonagem, mecanismos de transdução de sinais e especificidade farmacológica (Barnes e Sharp, 1999; Rang et al 2003). A ligação da 5-HT em cada tipo de receptor gera, por mecanismos distintos, respostas, também distintas.

Os dois principais grupos de receptores supostamente envolvidos na fisiopatologia da depressão são o 5-HT₁ e o 5-HT₂ (Barnes e Sharp, 1999); e são esses dois grupos de receptores os principais alvos terapêuticos para medicamentos antidepressivos (Middlemiss et al., 2002). Os receptores 5HT₁ estão ligados à proteína G inibitória que, quando ativada, age sobre a cascata

da adenilciclase/PKA. Já os receptores 5HT2 estão ligados à proteína Gq (outra subclasse da proteína G) que quando ativada estimula a via de fosfolipase C/PKC (revisado em Polter e Li, 2010). Estas duas vias, como descrito no item 1.1.2 (Fisiopatologia da depressão), vem sendo foco de diferentes estudos para elucidar a fisiopatologia e o tratamento da depressão.

Os receptores 5-HT1 ocorrem principalmente no cérebro; têm efeitos predominantemente inibitórios e são expressos como receptores pré-sinápticos (ou auto-receptores) (Barnes e Sharp, 1999). Esse grupo de receptores pode ser dividido em cinco subclasses, sendo que três delas são especialmente propostas como alvos de terapia: 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT1D (Middlemiss et al., 2002). Dentre estes os que têm maior papel na depressão são os receptores 5-HT1A (Gingrichand e Hen, 2001).

Quanto aos receptores 5-HT2, apesar de estarem presentes em abundância no córtex e no sistema límbico, são particularmente importantes no sistema periférico. Esse grupo de receptores também é dividido em subclasses (5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C), sendo que os receptores 5-HT2A são os mais importantes do ponto de vista funcional e são responsáveis por mediar os efeitos da 5-HT sobre as plaquetas (Rang et al., 2003).

1.4 Glicogênio sintase quinase-3

A glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) foi descrita inicialmente como uma enzima que fosforila a enzima glicogênio sintase que, por sua vez, tem papel fundamental na síntese do glicogênio. Atualmente sabe-se que, apesar do nome restritivo, a GSK3 exerce diferentes funções no metabolismo celular que vão desde a sobrevivência celular, metabolismo e processamento de proteínas, até processos cognitivos. (Grimes e Jope, 2001; Jope e Johnson, 2004; Jope e Roh, 2007). Na célula, influencia na arquitetura e na plasticidade, sendo fundamental em mecanismos como: divisão, proliferação, diferenciação e adesão celular (Grimes e Jope, 2001; Jope e Roh, 2007; Peineau et al., 2008). Por ter um papel de regulação de alguns fatores de transcrição, a GSK3 também regula a expressão gênica e está envolvida com apoptose e sobrevivência celular (Grimes e Jope, 2001; Planel et al., 2002; Li et al., 2004, 2006).

1.4.1 Bioquímica da GSK3

A proteína tem duas isoformas em mamíferos, GSK3A (51 kDa) e GSK3B (46 kDa) que são codificadas por diferentes genes (*GSK3A* e *GSK3B*, respectivamente) (Woodgett, 1990; O'Brien e Klein, 2007). Estas duas isoformas têm praticamente as mesmas propriedades (97% de similaridade no seu sítio catalítico), mas há diferenças em suas porções C e N terminais (Woodgett 1990,1991; Ali et al., 2001; Li e Iyengar, 2002) as quais lhes

conferem características e funções específicas, o que foi investigado e comprovado por estudos com animais *knock-out* para os genes acima referidos. A deleção do gene Gsk3B foi letal ao embrião, sugerindo que a atividade da GSK3B não é compensada pela atividade da GSK3A (Hoeftlich et al., 2000). Outro estudo verificou a diferença funcional entre as duas isoformas na cardiogênese em uma espécie de peixes; sendo a GSK3A essencial na sobrevivência celular e a GSK3B determinante na simetria e no posicionamento do órgão (Lee et al., 2007; Markou et al., 2008). Ou seja, cada isoforma tem sua função e não pode ser compensada pela síntese e/ou atividade da outra. Apesar disso, já foi demonstrado que ambas estão presentes e são essenciais, por exemplo, na formação de axônios em neurônios hipocâmpais (Garrido et al., 2007).

A GSK3B é uma proteína celular tradicionalmente considerada citosólica, porém também está presente nas mitocôndrias e no núcleo no qual se encontra altamente ativada, dado interessante considerando-se que é justamente no núcleo que muitos fatores de transcrição são regulados (Kaytor e Orr, 2002). Já foi demonstrado que a GSK3B modula uma série de processos de sinalização intracelular, inclusive regulando a expressão de alguns genes (Jope e Johnson, 2009). É mais expressa em tecido neural do que a GSK3A, e por isso é a mais estudada e até agora a mais relacionada a distúrbios que envolvem o sistema nervoso central (SNC) (Tsai et al., 2008).

A atividade da GSK3B é estreitamente regulada e o principal mecanismo conhecido, até hoje, para esta regulação é a fosforilação da enzima

(Kaytor e Orr, 2002; Li et al., 2004; Jope e Roh, 2006). A fosforilação do sítio tirosina 216 (tyr216) é necessária para a atividade normal da enzima e altos níveis de fosforilação resultam em ativação nas células em repouso. Quando a fosforilação ocorre no sítio serina 9 (ser9), inativa a GSK3B, mesmo que a porção tyr216 esteja também fosforilada. Caso haja uma desfosforilação do sítio ser9 a enzima será ativada (Peineau et al., 2008). A fosforilação do sítio ser9 pode ser mediada por diferentes quinases entre elas a PKA, a proteína quinase B (PKB ou Akt) e a PKC (Jope e Johnson, 2004). Portanto, diferentes sistemas de sinalização convergem para controlar a atividade da GSK3B, contribuindo para a regulação de suas funções celulares específicas (Li et al., 2006).

1.4.2 Patologias relacionadas à GSK3B

Dada à ampla distribuição tecidual da GSK3B e seu envolvimento em vias de sinalização celular, esta enzima tem sido objeto de estudos em doenças sistêmicas (diabetes, câncer, inflamação) e desordens do SNC, incluindo transtornos neurodegenerativos e psiquiátricos como transtornos de humor, esquizofrenia e DA (Dugo et al., 2007; Rayasam et al., 2009).

1.4.2.1 Transtornos neuropsiquiátricos

A associação da GSK3B com transtornos psiquiátricos é relativamente recente. Os primeiros estudos foram publicados em 1996, por Klein e Melton, descrevendo a enzima como alvo do lítio, o principal medicamento para o tratamento do transtorno bipolar (TAB) (Jope, 1999). Após isso, diferentes tipos de estudos foram realizados corroborando com a hipótese de que a característica de estabilizador de humor do lítio está exatamente relacionada à atividade da GSK3B. Baseando-se nesses achados surgiram novas hipóteses sobre a ação de outras medicações psiquiátricas em relação à GSK3B. A partir de então, a enzima tem sido cada vez mais investigada e relacionada a este campo da pesquisa e da medicina.

a) Esquizofrenia

Evidências sugerem que a GSK3B pode ter um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia (Bibb, 2005). Estudos recentes verificaram a associação de vias intracelulares de regulação *downstream* dos receptores D2 e a GSK3B. Além disso, há estudos que sugerem a ação de antipsicóticos sobre a GSK3B (Emamian et al., 2004; Kang et al., 2004; Li et al., 2006) e que descrevem alguns genes ligados tanto à esquizofrenia quanto a vias de regulação da GSK3B (Emamian et al., 2004).

b) Doença de Alzheimer (DA)

A DA é uma doença neurodegenerativa associada à cognição e ao comportamento e causa principal da demência em idosos. O diagnóstico definitivo ainda não é possível em vida, mas *post mortem* o cérebro de pacientes acometidos pela DA é caracterizado pela presença de emaranhados neurofibrilares e placas senis (Lewis et al., 1998). Emaranhados neurofibrilares são formados no meio intracelular do neurônio pelos chamados filamentos helicoidais pareados (FHP) que são uma agregação de proteína TAU (proteína associada aos microtúbulos) em seu estado hiperfosforilado. Já as placas senis, são formadas no meio extracelular por peptídeos beta-amilóide (A β) produto da clivagem da proteína precursora do amilóide (APP) na via amiloidogênica.

Cascatas de sinalização celular e molecular que envolvem a GSK3B já foram associadas à patogenia da DA. Estudos imuno-histoquímicos permitiram observar uma relação do aumento da expressão e da atividade da enzima GSK3B com os emaranhados neurofibrilares no cérebro de pacientes com DA. Além disso, estudos têm demonstrado que a GSK3B interage com a APP (Bayatti et al., 2003; Ryder et al., 2003; Akiyama et al., 2005), favorecendo a clivagem e a liberação do peptídeo A β . Este é capaz de favorecer a ativação da GSK3B o que, por sua vez, leva à hiperfosforilação da TAU (Takashima et al., 1993; Hong et al., 1997) contribuindo assim para a formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares (Grimes & Jope, 2001). Portanto, no que se

refere à neurobiologia da DA, a GSK3B exerce um papel importante nos dois principais mecanismos patogênicos.

c) Transtornos do humor

A GSK3B surgiu no cenário psiquiátrico a partir de estudos no TAB. O lítio já era usado para o tratamento dos pacientes, mas em 1996, com estudo de Klein e Melton, a GSK3B foi descrita como um alvo biológico deste estabilizador de humor. Sabe-se que o lítio inibe a GSK3B e que sua ação é relativamente seletiva (Davies et al., 2000), porém esse mecanismo de inibição ainda não está elucidado. Dados prévios do nosso laboratório sugerem que o lítio interfere na concentração de mRNA do gene *Gsk3b* em cérebro de ratos: observou-se uma redução dose-dependente em cultura de hipocampo (Mendes et al., 2009). Com essas evidências sobre o lítio e a constatação de que, na verdade, ele regula o nível de ativação da GSK3B, observou-se que nos distúrbios de humor a GSK3B está desequilibrada (Jope e Roh, 2007). A maioria dos estudos que relacionam a GSK3B aos transtornos de humor se baseia na ação da medicação sobre esta enzima e inferem, a partir do efeito observado, a consequência desta desregulação.

Além desses estudos que levam em consideração a ação dos medicamentos, há também estudos realizados com cérebro *post mortem* que mensuraram a quantidade e a atividade da enzima em cérebro humano. Karege e colaboradores (2006), por exemplo, encontraram aumento da atividade da

GSK3B em pacientes com transtorno de humor. Neste estudo não foi verificada a fosforilação da enzima, deixando aberta a possibilidade de haver algum outro mecanismo de regulação.

Na depressão unipolar, mais especificamente, acredita-se que a GSK3B está hiperativada e que, conseqüentemente, a inibição da enzima pode estar relacionada aos efeitos terapêuticos dos antidepressivos (Tsai et al., 2008). Estudos com o lítio mostraram que houve uma inibição da GSK3B tanto em cérebro de ratos (Klein e Melton, 1996; Stambolic et al., 1996) quanto em células mononucleares de sangue periférico humano (Li et al., 2007). Além disso, observou-se que o tratamento com imipramina e fluoxetina inibiu a GSK3B em cérebro de ratos por meio da fosforilação da porção ser9 (Li et al., 2004). Outro fator a ser levado em consideração é a associação do metabolismo e do funcionamento da GSK3B a outras proteínas que sabidamente tem relação com os efeitos antidepressivos de determinados medicamentos (Mai et al., 2002). Há ainda estudos que verificaram que a enzima pode ser regulada por antidepressivos que têm ação sobre a neurotransmissão serotoninérgica (Li et al., 2004; Beaulieu, 2007).

1.5 GSK3, 5-HT e depressão

Inúmeros estudos estão focados em identificar vias de sinalização intracelular combinadas com receptores 5-HT que possam ser associadas a

transtornos de humor podendo surgir como novos alvos terapêuticos (Jope e Roh, 2006). Uma hipotética deficiência serotoninérgica na depressão torna interessante alguns achados sobre a contribuição da atividade de 5-HT no controle inibitório da GSK3. A deficiência nos níveis de 5-HT pode estar intimamente ligada a alguma anormalidade na atividade de GSK3 (Jope e Roh, 2006).

Aumentando os níveis de 5-HT, pela ação de fármacos específicos para inibição da recaptação do neurotransmissor, a fosforilação na porção ser9 também aumenta, inibindo a GSK3B no cérebro de ratos (Li et al., 2004). Este estudo demonstrou que a estimulação do receptor 5-HT1A ou o bloqueio do receptor 5-HT2 pela administração de agonistas seletivos *in vivo* provoca um aumento na fosforilação da GSK3B no sítio ser9.

O equilíbrio entre os receptores 5-HT1A e 5-HT2 na regulação da fosforilação da GSK3 é um achado bastante curioso, já que a desregulação desses receptores está associada à depressão (Jope e Roh, 2006). Alguns estudos sugerem que nos pacientes com distúrbio depressivo maior há um déficit de receptores 5-HT1A e um excesso de receptores 5-HT2, o que faz diminuir a fosforilação inibitória da ser9 (Li, 2004, 2006; Jope e Roh, 2006). Com base nesse dado, uma das hipóteses sobre a ação dos antidepressivos é que estes restauram o balanço entre estes dois grupos de receptores cerebrais, regulando a fosforilação da GSK3B, fazendo com que atinja seus níveis normais (Jope e Roh, 2006; Li et al., 2006).

1.6 Plaquetas

A proposta de utilizar plaquetas como modelo neurofarmacológico surgiu em meados de 1954 devido a descoberta que seus grânulos armazenavam 5-HT (Barradas e Mikhailidis, 1993).

Foram descritas e comprovadas algumas similaridades entre plaquetas e neurônios que têm permitido o uso das plaquetas como modelo periférico do metabolismo cerebral: plaquetas estocam e liberam neurotransmissores; a liberação dos grânulos é controlada pela concentração intracelular de cálcio; expressam algumas proteínas de membrana relacionada com neurônios; e apresentam processos na membrana plasmática semelhante a neurites que são provocadas por proteases extracelulares. Contudo, as plaquetas há muitos anos são usadas como matriz na busca de marcadores clínicos em desordens neuropsiquiátricas como depressão, esquizofrenia e DA (Bush e Tanzi, 1998, Di Luca et al., 2000).

De acordo com estas observações, as plaquetas podem ser úteis para se estudar mecanismos metabólicos espelhando, num compartimento periférico, a evolução de processos bioquímicos que ocorrem no sistema nervoso central relacionados com o transtorno depressivo maior. É importante ressaltar a facilidade e conveniência na obtenção das plaquetas, o que também

são características importantes de um candidato a matriz biológica de biomarcador (Padovani et al., 2001).

1.7 Sertralina

A sertralina é um antidepressivo da classe dos ISRSs e por isso tem sua ação específica sob a receptação da 5-HT. Esta especificidade, associada à sua baixa meia-vida (26h), conferem à sertralina um perfil de baixa incidência de efeitos adversos mesmo quando comparada a outros antidepressivos da mesma classe farmacológica. Os níveis plasmáticos estáveis de sertralina são alcançados após uma aproximadamente semana com uma dose única diária. A mesma dosagem indicada para pacientes mais jovens pode ser utilizada em pacientes idosos

No tratamento de idosos a sertralina se mostrou mais eficaz em relação ao placebo e comparável a outro inibidor seletivo de recaptação de serotonina, a fluoxetina, e aos tricíclicos amitriptilina, nortriptilina e imipramina; inclusive apresentando menos efeitos colaterais. Além disso, a sertralina foi mais eficaz do que a fluoxetina ou a nortriptilina no subgrupo dos maiores de 70 anos (Muijsers et al., 2002).

Por este perfil seguro e por sua eficácia e tolerabilidade a sertralina foi escolhida para o tratamento dos indivíduos recrutados para o nosso estudo.

2 OBJETIVOS

Objetivo primário: Investigar os efeitos do tratamento com sertralina sobre a 5-HT e a GSK3B plaquetárias em indivíduos idosos com diagnóstico de transtorno depressivo maior.

Objetivos secundários: (1) Validar método de quantificação da 5-HT por cromatografia líquida de alta eficiência e (2) validar as técnicas de *western blotting* e *immunoblotting* para quantificação das porções fosforilada (pGSK) e total (GSKT) da enzima GSK3B.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Número de protocolo: 847/09 (Apêndice A).

Todos os indivíduos recrutados assinaram um termo de consentimento (Apêndice B), após receberem informações detalhadas por escrito sobre a natureza e objetivos do estudo. As informações geradas serão tratadas como dados confidenciais. A identidade de todos os participantes será protegida em publicações originadas do estudo.

3.1.1 Caracterização clínica

Foram recrutados pacientes de ambos os sexos, a partir de 65 anos, portadores de transtorno depressivo maior (episódio único ou recorrente), admitidos no Ambulatório de Psiquiatria Geriátrica, Laboratório de Neurociências – LIM 27, Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, e que na época da primeira consulta não fizessem uso de medicações antidepressivas por pelo

menos um mês. Os pacientes candidatos a participar do estudo foram examinados do ponto de vista psiquiátrico, neurológico e clínico-laboratorial e passaram por testes de avaliação das funções cognitivas, no momento da admissão no estudo.

Não foram selecionados para o estudo pacientes que apresentassem:

(1) deficiências sensoriais e/ou intelectuais que os impedissem de desempenhar adequadamente os testes necessários para avaliação das funções cognitivas; (2) quadro demencial pré-existente; (3) doenças clínicas ou neurológicas com impacto sobre a capacidade cognitiva; (4) pacientes com diagnóstico de doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central (por exemplo, doença de Parkinson); (5) evidência clínica prévia de ataque isquêmico transitório ou acidente vascular cerebral (AVC); (6) pacientes clinicamente instáveis ou com saúde frágil no momento da avaliação inicial; (7) outros transtornos psiquiátricos maiores, tais como esquizofrenia e transtorno bipolar; (8) história ou evidências de alcoolismo ou abuso de substâncias depressoras do sistema nervoso central; (9) com diagnóstico de diabetes ou síndromes metabólicas; (10) uso recente ou atual de medicamentos com propriedades anticolinérgicas; (11) uso atual de medicações antidepressivas; (12) recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

A avaliação do episódio depressivo maior (Transtorno Depressivo Maior, episódio único ou recorrente) foi realizada por meio da versão brasileira da Entrevista Clínica Estruturada para o Diagnóstico de Transtornos Mentais do Eixo I do DSM IV (SCID – I/P) (First et al., 2002).

A seleção dos controles foi realizada de acordo com os mesmos critérios para inclusão e exclusão utilizados para pacientes. Com a diferença de não haver o diagnóstico de transtorno de humor.

3.1.2 Amostra recrutada

Os pacientes coletaram sangue em três momentos: antes do início do tratamento (*baseline*, visita 1), após 3 meses de tratamento (visita 2) e após 12 meses de tratamento (visita 3). Todos os pacientes foram tratados com sertralina (dose entre 50 e 200 mg/dia). Os controles compareceram apenas uma vez, não recebendo qualquer medicação.

Foram colhidas amostras de sangue de 49 indivíduos com diagnóstico de depressão maior (22 de início tardio e 16 de início precoce), sendo que 35 seguiram o tratamento até 3 meses e 18 completaram 12 meses de tratamento com sertralina (Quadro 1). Os motivos para interrupção do tratamento foram: mudança da medicação ou desistência do tratamento por parte do paciente.

Figura 1 - Fluxograma de desistência de pacientes ao decorrer do tratamento e amostras disponíveis para análise em cada etapa.

Não houve diferença de idade entre o grupo controle e os grupos de pacientes. A escolaridade foi avaliada quanto aos anos de estudo e os grupos também não apresentaram diferença (Tabela 1).

Tabela 1- Descrição da amostra e distribuição dos indivíduos envolvidos no estudo.

	V1 (n=39)	V2 (n=32)	V3 (n=16)	Controle (n=18)
Sexo	29F,10M	25F, 8M	11F,5M	13F,5M
Idade (anos)	70,2 (5,0)	69,9 (4,5)	72,2 (4,0)	75,3 (6,8)
Escolaridade (anos)	8,5 (3,6)	7,2 (4,7)	10,1 (4,5)	11,4 (5,1)
HDRS-21	19,9 (6,4)	7,0 (4,7)	4,6 (8,5)	-

Sendo que: HDRS-21: Hamilton Depression Rating Scale, 21 itens V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento; F= feminino, M= masculino.

3.2 Métodos de análise das amostras

Foram coletados 20ml de sangue periférico de cada um dos idosos avaliados e recrutados de acordo com os critérios estabelecidos. A matriz de análise para a quantificação da 5-HT foi o plasma rico em plaquetas (PRP) e para a análise da GSK3B, apenas as plaquetas. As coletas foram realizadas no Laboratório LIM-27.

3.2.1 Determinação da 5-HT

3.2.1.1 Obtenção de PRP

As amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo anticoagulante EDTA. O plasma foi separado imediatamente após a centrifugação do sangue a 300 x g por 15 minutos. As plaquetas foram quantificadas em um contador de células (ABX pentra 60 C+ (Horiba ABX)) e armazenadas em freezer -80 °C para posterior análise. A quantidade de 5-HT das amostras foi corrigida pelo número de plaquetas.

3.2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As soluções e os padrões foram mantidos a 4°C até o momento do uso e em gelo durante todo o processamento. Os PRPs foram descongelados em gelo e apenas nas quantidades necessárias a cada análise.

A extração foi realizada a partir de 250 µL de PRP ao qual se adicionou 50µL de ácido perclórico (HClO₄ 3,4M). Agitou-se em vórtex por 15 segundos e centrifugou-se a 14000 x g por 20 minutos a 4 °C. Imediatamente após a centrifugação, com os tubos sempre mantidos em gelo, pipetou-se 200 µL do

sobrenadante e 20 µL de padrão externo (5-metoxitriptamina) na concentração 0,001 mg/mL em *vials* de HPLC adequados para injeção automática.

Foram testados métodos de gradiente com o objetivo de melhorar a resolução do método.

- Método gradiente (Tabelas 2 e 3) com fase móvel A constituída por tampão fosfato de sódio diácido com SDS (10 µM), acetonitrila e metanol (70:15:15 v/v/v); fase B constituída por tampão fosfato de sódio diácido com SDS (10 µM), acetonitrila e metanol (20:65:15 v/v/v).

Tabela 2 - Primeiro gradiente testado: fluxo e concentração das bombas de acordo com o tempo de corrida.

Tempo (min)	Bomba (% B)	Fluxo (mL/min)
0,01 – 5,5	20	0,8
5,5 – 6,0	50	1,0
6,0 – 14,0	50	1,0
14,0 – 14,5	20	0,8

Tabela 3 - Segundo gradiente testado: concentração das bombas de acordo com o tempo de corrida.

Tempo (min)	Bomba (%B)
0,01 – 6,0	0
6,0 – 6,5	20
6,5 – 10,0	20
10,0 – 14,0	0

- Método isocrático (fluxo 0,8 mL/min) com fase móvel constituída por tampão fosfato de sódio diácido com SDS (10 uM), acetonitrila e metanol (80:10:10 v/v/v)
- Método isocrático (fluxo 0,8 mL/min) com fase móvel constituída por tampão fosfato de sódio diácido com SDS (10 uM), acetonitrila e metanol (70:15:15 v/v/v)

Tanto a 5-HT quanto o padrão externo possuem fluorescência nativa. Essa característica permite o uso de um detector de fluorescência que é mais seletivo em relação ao UV e permite uma boa resolução dos picos.

3.2.1.3 Validação do método de HPLC

Extração: A partir de 250 uL de PRP, foi realizada uma precipitação com ácido perclórico 1 M (50 uL).

Fase móvel: Tampão fosfato de sódio + SDS (10 uM): acetonitrila: metanol (70:15:15 v/v/v).

Padrão externo: hidrocloreto de 5-metoxitriptamine.

Curva padrão: 600, 400, 200, 100, 50, 25 ng/mL (Figura 2).

Coluna: C₁₈ Perkin-Elmer.

Comprimento de onda: 270 nm (excitação) e 330 nm (emissão).

Fluxo: 0,8 mL/min.

Temperatura: 35 °C.

Ganho: x 1.

Resposta: 2.

Tempo de retenção da 5-HT: 6,8 min.

Tempo de retenção do padrão externo: 9,6 min.

Tempo de análise: 12 min.

Figura 2 - Cromatogramas de diferentes pontos da curva de calibração: 25 ng/mL (A), 100 ng/mL (B) e 600 ng/mL (C).

3.2.2 Determinação da GSK3B

Os níveis de GSK3B plaquetária foram analisados pelo método de ELISA utilizando kits comerciais (TiterZyme EIA – Assay Designs Inc., MI, USA) e posteriormente confirmados pelo método de *blotting* (como descrito no ANEXO B). Como as escalas dos métodos eram diferentes, para compará-los foi necessário uma padronização: (valor+media)/dp. Com os valores calculados fez-se o T-Test pareado. Obteve-se que o *blotting* e o ELISA se equivalem tanto no que diz respeito à GSKT ($p=0,99$) quanto à pGSK ($p=0,75$). As diferenças foram mais evidentes pelo método de ELISA.

Em ambos os testes de quantificação da proteína GSK3B, foram obtidos resultados da quantidade de GSKT e pGSK. A partir destes dados foram inferidos os valores da GSK3B ativa (não-fosforilada no sítio ser9) com o cálculo da razão pGSK/GSKT (rGSK), como descrito anteriormente pelo nosso grupo (Forlenza et al., 2010). A rGSK nos informa sobre a proporção entre a concentração da forma inativa da proteína (i.e. pGSK) e a sua concentração total em uma amostra. Portanto, quanto menor rGSK, maior a atividade enzimática e vice-versa.

3.2.2.1 Obtenção e preparo das plaquetas

Para o preparo das amostras foram testados dois protocolos já realizados na rotina do laboratório.

Preparo A: Foram coletados 20 mL de sangue em tubos do tipo *monovet* (Sarstedt) contendo anticoagulante citrato de sódio. Adicionou-se 200µL de EDTA 0,09 M para cada 10 mL de sangue. Homogeneizou-se delicadamente por inversão e centrifugou-se por 10 minutos a 1300 rpm a 20 °C. O sobrenadante PRP foi transferido para tubo com capacidade de 15 mL (tipo falcon) e centrifugado por 15 minutos a 2400 rpm a 20 °C. O sobrenadante foi removido por inversão e o *pellet* de plaquetas foi lavado com 5 mL de Tris 10 mM, pH 7,4. Desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido com aproximadamente 1 mL de tampão de lise, contendo inibidores de proteases. As plaquetas foram congeladas e descongeladas para facilitar a lise e armazenadas em criotubos em freezer –70 °C.

Preparo B: foram coletados 20 mL de sangue em *monovet* contendo anticoagulante citrato de sódio. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de ACD-NH e homogeneizou-se delicadamente por inversão. Centrifugou-se durante 15 minutos a 1600 rpm a 20 °C. O sobrenadante PRP foi transferido para tubo com capacidade de 50 mL (tipo falcon) e o pH ajustado para 6,5 com ACD-NH. Transferiu-se o PRP para 2 tubos de poliestireno. Centrifugou-se durante 10 minutos a 2400 rpm a 20 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão. Foram adicionados 2,5 mL de solução de lavagem e permaneceu em

repouso por 10 minutos. As plaquetas foram cuidadosamente homogeneizadas com pipeta e adicionou-se mais 2,5 mL de solução de lavagem. Centrifugou-se por 8 minutos a 2400 rpm. O sobrenadante foi removido e cada *pellet* ressuspenso delicadamente com 500 µL de tris-sacarose.

Após os dois preparos ainda testamos diferentes protocolos de lise celular, com o objetivo de disponibilizar no meio a maior quantidade possível das proteínas de interesse, mas interferindo minimamente em suas propriedades físico-químicas:

- 1) Congelamento por 30 minutos a -80 °C, descongelamento, separação em alíquotas e armazenamento em freezer -80 °C.
- 2) Separação de alíquotas e armazenamento em freezer -80 °C e descongelamento no gelo apenas no momento de preparo da amostra para análise.
- 3) Separação de alíquotas e armazenamento em freezer -80 °C e descongelamento a temperatura ambiente apenas no momento de preparo da amostra para análise.

O preparo da amostra para a quantificação da enzima GSK3B foi validado levando-se em consideração a necessidade de manter a plaqueta em condição mais parecida possível à do momento da coleta. Para tanto foi utilizado o preparo B no qual as plaquetas são separadas por métodos físicos e adicionam-se soluções para impedir a ativação ou agregação plaquetárias até o congelamento das amostras. No momento do experimento, após as amostras serem descongeladas, adicionou-se inibidores de proteases e fosfatases.

3.2.2.2 Determinação de proteína das amostras

Após o preparo da amostra, uma alíquota de 50 µL foi destinada à determinação de proteínas totais. As proteínas foram quantificadas utilizando o kit Bio-Rad *DC Protein assay* (Bio-Rad Hercules) que é um ensaio colorimétrico para a determinação de proteínas, baseado no método de *Lowry* (Lowry et al., 1951). O ensaio consiste na reação de proteínas com uma solução alcalina de tartarato de cobre (Reagente A) e com o reagente de folin (*1,2-naphthoquinone-4-sulfonate*) (Reagente B). São duas etapas que levam ao aparecimento da cor cuja absorbância foi lida a 680 nm (Peterson, 1979). A determinação da concentração de proteínas totais foi obtida por meio de uma curva padrão de proteínas, empregando-se albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* ou BSA; Sigma-Aldrich) nas concentrações: 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL.

3.3 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico SPSS v. 14 (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL). O teste de Modelos de Efeitos Mistos foi utilizado para avaliar as variáveis GSKT, pGSK, rGSK e 5-HT longitudinalmente. Para comparação dos grupos de paciente com o grupo controle utilizou-se o teste de ANOVA. O teste de

correlação foi realizado para avaliar a correlação entre 5-HT e GSK3B nas diferentes visitas. Para a análise da correlação da variável clínica e GSK3B utilizou-se o teste *time series*. O teste T-student pareado foi realizado para avaliar a equivalência metodológica entre *blotting* e ELISA. A significância estatística para todas as análises realizadas foi estabelecida para valores de $p \leq 0,05$ ($\alpha = 95\%$).

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação da 5-HT

Foram analisadas 75 amostras de PRP para a quantificação 5-HT por HPLC. Havia três grupos de amostra: pacientes na visita 1, visita 2 e visita 3 (Tabela 4). Houve uma diminuição de 5-HT durante o tratamento com sertralina (Figura 3), sendo mais marcante nos primeiros 3 meses (V1-V2) ($p=0,03$). Observamos diminuição da 5-HT ($p=0,053$) com 12 meses de tratamento.

Figura 3 - Comparação de concentração de 5-HT por plaquetas nas diferentes visitas. Diminuição da 5-HT em 3 meses de tratamento ($\#p=0,032$). Sendo que V1= pré-tratamento ($n=33$); V2= 3 meses de tratamento ($n=30$), V3= 12 meses de tratamento ($n=12$).

Tabela 4 - Médias e desvios padrão da concentração de 5-HT nas diferentes visitas.

Visita	Média (5-HT $\pm$ dp) (ng/10 ⁹ Pq)
V1 (n=33)	506 ($\pm$ 315)
V2 (n=30)	407 ($\pm$ 306)
V3 (n=12)	315 ($\pm$ 290)
p	0,132

Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento.

4.2 Quantificação da GSK3B

Foram analisadas 90 amostras de plaquetas tanto para a quantificação de GSKT quanto para pGSK por ELISA. Por esta metodologia analisamos além das visitas 1, 2 e 3 um grupo controle de idosos saudáveis.

Quando comparadas amostras de pacientes não medicadas às de controle, observamos maiores níveis de pGSK ($p < 0,01$) no grupo de pacientes. A GSKT e a rGSK foram semelhantes entre pacientes e controles (Tabela 5).

Durante o tratamento observou-se uma redução de pGSK ($p = 0,037$) e rGSK ($p = 0,034$) durante o tratamento. Não houve mudanças significativas da GSKT (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias e desvios padrão de GSKT, pGSK e rGSK nas visitas 1, 2, 3 e controles.

GSK3B (pg/mL)	V1(n=39)	V2 (n=32)	V3 (n=15)	Controle (n=18)
GSKT	3701 (1022)	3918 (1039)	4489 (683)*	3677 (950)
pGSK	1163 (472)**	1078 (407)**	915 (418)	689 (167)
rGSK	0,33 (0,15)	0,30 (0,12)	0,23 (0,08)	0,19 (0,05)

Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento. GSKT: GSK3B total; pGSK: GSK3B fosforilada; rGSK: pGSK/GSKT. **p<0,01 *p<0,05

Após um ano de tratamento observou-se um aumento da GSKT dos pacientes ($p=0,022$), distanciando dos níveis de controles ($p=0,016$) (Figura 4). Com relação à pGSK não houve diminuição significativa, mas mesmo assim os níveis se aproximaram aos do grupo de controles (Figura 5). A rGSK também diminuiu nos pacientes após um ano de tratamento ($p=0,001$). Além disso, foi encontrada diminuição da visita 2 para a visita 3 ($p=0,001$) (Figura 6).

Figura 4 - Comparação da enzima GSKT nas três visitas e grupo controle, observando-se aumento ($p=0,022$) da V1 para a V3, e da V2 para a V3 (0,046); diferença entre controle e visita 3 ($p=0,016$). Utilizou-se modelo de efeitos mistos para comparação entre as visitas e ANOVA para comparação dos grupos de paciente e controle, $p\leq 0,05$. Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento.

Figura 5 - Comparação da enzima pGSK nas três visitas, observando-se maior quantidade de enzima em V1 quando comparado com controle ($p=0,000$), e em V2 também quando comparado com controle ($p=0,000$). Utilizou-se modelo de efeitos mistos para comparação entre as visitas e ANOVA para comparação dos grupos de paciente e controle, $p\leq 0,05$. Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento.

Figura 6 - Comparação da rGSK nas três visitas, observando-se diminuição da razão após 3 meses de tratamento (V2, $p=0,001$) e também após 12 meses de tratamento (V3, $p=0,001$). Utilizou-se modelo de efeitos mistos para comparação entre as visitas e ANOVA para comparação dos grupos de paciente e controle, $p\leq 0,05$. Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento.

4.3 Correlação entre 5-HT e GSK3B

Foi feito o cálculo de correlação entre todas as variáveis: GSKT e 5-HT, pGSK e 5-HT, rGSK e 5-HT; nas três visitas (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlações entre 5-HT e GSKT, 5-HT e pGSK, 5-HT e rGSK nas visitas 1, 2 e 3.

		5-HT
GSKT	V1	$\hat{\rho} = -0,046$ ($p = 0,836$)
	V2	$\hat{\rho} = 0,064$ ($p = 0,772$)
	V3	$\hat{\rho} = 0,342$ ($p = 0,452$)
pGSK	V1	$\hat{\rho} = -0,540$ ($p = 0,008$) *
	V2	$\hat{\rho} = -0,224$ ($p = 0,317$)
	V3	$\hat{\rho} = -0,338$ ($p = 0,115$)
rGSK	V1	$\hat{\rho} = -0,338$ ($p = 0,115$)
	V2	$\hat{\rho} = -0,162$ ($p = 0,461$)
	V3	$\hat{\rho} = -0,305$ ($p = 0,506$)

Foi encontrada uma correlação negativa entre 5-HT e pGSK ($\hat{\rho} = -0,54$; $p = 0,008$) (Figura 7) antes do tratamento. Esta correlação perdeu significância após o início do tratamento com sertralina (V2 e V3, Tabela 6)

Figura 7 - Correlação entre pGSK e 5-HT na visita 1 ($\hat{\rho} = -0,54$; $p = 0,008$).

4.4 Correlação de dados clínicos e GSK3B

Como esperado, a pontuação na escala Hamiltom (HDRS-21), diminuiu significativamente tanto após 3 meses de tratamento ($p=0.001$) quanto após um ano ($p=0.001$). Porém, não observamos correlações entre a melhora clínica dos pacientes e pGSK ($p=0,62$) ou GSKT e ($p=0,35$).

Além disso, dividimos os pacientes em respondedores e não respondedores, baseados na melhora da escala HDRS-21 nos 3 primeiros meses de tratamento. Não observamos diferenças nos níveis de pGSK ($p=0,89$) ou GSKT ($p=0,56$) entre os dois grupos.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo comparamos as concentrações da GSK3B em pacientes idosos com depressão com um grupo de controles sadios. A GSK3B foi determinada em plaquetas e os pacientes estavam por ao menos um mês sem medicação. Após a coleta inicial estudamos os efeitos de um tratamento com o ISRS sertralina por 12 meses na GSK3B e nas concentrações de 5HT plaquetária.

Encontramos que a pGSK e a rGSK de pacientes antes da medicação foram maiores do que a do grupo controle. Três meses após o início do tratamento com sertralina, encontramos uma diminuição da pGSK e o aumento da GSKT, diminuindo assim a rGSK. Esta diminuição de ambas continuou até os 12 meses de tratamento, aproximando-se dos valores dos controles. Por outro lado, houve um aumento significativo dos níveis de GSKT em relação ao baseline e aos controles.

De nosso conhecimento este é o primeiro relato de um aumento da pGSK e GSKT em plaquetas de idosos com depressão. Este achado deve ser interpretado com reservas devido ao pequeno tamanho da amostra. Todavia, como veremos a seguir, estes achados são compatíveis com uma diminuição da sensibilidade de receptores 5HT₂, que é a hipótese prevalente da depressão (REF).

A fosforilação no sítio serina 9 da GSK3B torna-a inativa (Li et al., 2004; Jope e Roh, 2006), o que parece ter um efeito neuroprotetor (Chin et al., 2005; Nunes et al., 2007). E, ao contrário, a diminuição da fosforilação parece estar relacionada à neurodegeneração (Kaytor e Orr, 2002). No cérebro a fosforilação da GSK3B é estimulada pelo receptor 5-HT1 e inibida pelo receptor 5-HT2 (Li et al., 2004). Estes receptores estão mais diretamente envolvidos com a ação dos ISRSs (Stahl et al., 2010). As plaquetas, por outro lado, têm apenas o receptor 5-HT2 (Rang et al., 2003). Em face desses dados, podemos supor que o nosso achado de uma redução da pGSK durante o tratamento resultou do efeito da sertralina nos receptores 5-HT2 em plaquetas. É necessário ainda esclarecer os mecanismos pelos quais a estimulação de receptores 5-HT2 reduz a fosforilação da GSK3B. Todavia, a diferença de populações de receptores de 5-HT em plaquetas e em neurônios limita a extrapolação de nossos resultados em plaquetas para explicar os efeitos de ISRSs na GSK3B cerebral.

Em nossa amostra não encontramos correlações entre as alterações de GSK3B e 5-Ht durante o tratamento e a resposta terapêutica à sertralina. Isto não significa que as mudanças destes parâmetros biológicos não estejam relacionadas às mudanças clínicas, que provavelmente ocorreram antes do prazo de 3 meses, quando então as mudanças biológicas foram analisadas pela primeira vez após o início do tratamento. Além disso, no tratamento da depressão existe uma latência entre a ocorrência das primeiras alterações biológicas e o início da resposta clínica. No caso de receptores de 5-HT há evidências de que o aumento agudo da concentração de 5-HT na fenda

sináptica é suficiente para provocar os primeiros efeitos colaterais, mas não os primeiros efeitos terapêuticos. Esses só são observados após algumas semanas de tratamento, quando os receptores pós-sinápticos de 5-HT se tornam dessensibilizados, e a ligação do neurotransmissor gera sinais detectados pelo genoma da célula-alvo, alterando a expressão gênica dos receptores responsáveis pelos efeitos indesejados (Stahl, 2010).

Nos pacientes com depressão tratados com sertralina por um ano, observou-se uma diminuição da 5-HT plaquetária, que foi mais marcante nos primeiros meses do tratamento. Uma diminuição da 5-HT plaquetária após o tratamento com ISRSs já havia sido descrita com o uso crônico de outros medicamentos antidepressivos desta classe (ISRSs) (Bakish et al., 1997; Neuger et al., 2000; Blardi et al., 2002). Trabalhos *in vitro* de Brenner e colaboradores (2007) descrevem que a alta concentração de 5-HT no meio extracelular diminui a quantidade de SERT de membrana; o cenário oposto – diminuição de 5-HT no meio extracelular – aumenta a quantidade de transportadores. A quantidade de SERT está diretamente associada à concentração plaquetária e plasmática de 5-HT. Aumentando então a concentração extracelular de 5-HT pela inibição da recaptação com o uso da sertralina, há uma dessensibilização dos SERT. Nossos achados sugerem que a sertralina pode modular a recaptação de serotonina não só no SNC, mas também nas plaquetas.

A relação entre depressão e demência, em especial a decorrente de DA, vem sendo descrita por diversos estudos. Quadros depressivos são

considerados risco para demência, principalmente no caso de depressão de início tardio (Gallassi et al., 2006). Além disso, a gravidade dos episódios depressivos tem sido associada ao maior risco de desenvolvimento da demência (Kessing, 1998; Kessing e Andersen, 2004). Apesar de não serem claros os mecanismos, algumas vias de associação são propostas: 1) aumento da produção de A-beta e decorrente formação de placas amilóides; processo que pode estar ligado a vias serotoninérgicas (Keowkase et al., 2010). 2) aumento de citocinas que podem interferir em mecanismos pró-inflamatórios do SNC ou até mesmo no metabolismo de 5-HT (Maes et al., 2009; Adler et al., 2006; Leonard, 2007; Rojo et al., 2008). 3) diminuição do nível e da atividade de fatores neurotróficos, necessários para manutenção neuronal e plasticidade sináptica, por exemplo, o BDNF (Masi e Brovedani, 2011).

Em nossa amostra, o tratamento com sertralina reduziu a pGSK. Como a pGSK é supostamente relacionada à neuroproteção (Li et al., 2004), poder-se-ia supor que o uso contínuo de sertralina reduziria a neuroproteção, aumentando assim o risco para demência. Embora Kessing e colaboradores (2009) encontraram que o tratamento crônico com antidepressivos *tricíclicos* reduz o risco para demência, este achado não se confirmou para ISRSs.

Todavia, estudos em cultura de neurônios hipocampais sugerem que a sertralina aumenta a proliferação neural (Anacker et al., 2011) e estimula a diferenciação de precursores neuronais (Peng et al., 2011). Assim, é improvável que o aparente mecanismo de redução de neuroproteção por sertralina em plaquetas esteja refletindo o efeito deste ISRS em neurônios.

Em nosso estudo encontramos em plaquetas de idosos com depressão alterações da GSK3B que tenderam a se normalizar após tratamento antidepressivo. Como notamos, neste contexto, as plaquetas refletem apenas de forma parcial o que ocorre no SNC. Todavia, nossos resultados sugerem que o modelo em plaquetas pode ser útil para estudar os efeitos de ISRSs no metabolismo da GSK3B e, provavelmente, em outros processos mediados por receptores 5HT2.

6 CONCLUSÃO

Pudemos observar que a sertralina modula tanto a 5-HT quanto a GSK3B plaquetárias e que o tratamento por um ano é mais efetivo nesta modulação. Tanto a ação antidepressiva quanto a ação neuroprotetora da sertralina podem estar associadas a essas vias de sinalização.

Com relação aos métodos podemos concluir que: para determinação de GSK3B total e fosforilada, foi validado o método de Elisa como equivalente ao método de blotting, permitindo a mensuração deste biomarcador de uma maneira mais rápida. Para a determinação da serotonina foi validado um método sensível e preciso por cromatografia líquida de alta eficiência.

REFERÊNCIAS

- Adler UC, Marques AH, Calil HM. Inflammatory aspects of depression. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2006; 7, 19–23.
- Akiskal HA, Costa e Silva AJ, Frances A, Freeman HL, Keller MB, Lapierre YD, et al. Dysthymia in clinical practice. *Br J Psychiatry*. 1995;166:174-83.
- Akiskal HS. Dysthymia: clinical and external validity. *Acta Psychiatr Scand*. 1994;89(383):19-23.
- Akiskal HS. Dysthymia and cyclothymia in psychiatric practice a century after Kraepelin. *J Affect Disord*. 2001;62:17-31.
- Akiyama H, Shin RW, Uchida C, Kitamoto T, Uchida T. Pin1 promotes production of Alzheimer's amyloid beta from beta-cleaved amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005;336:521-9.
- Alexopoulos GS, Chester JG. Outcomes in geriatric depression. *Clinics in Geriatric Medicine*. 1992;8:363-73.
- Alexopoulos GS, Kate IR, Reynolds CF 3rd, Carpenter D, Docherty JP. Pharmacotherapy of depressive disorders in older patients. *Postgrad Med*. 2001;Spec n° Pharmatherapy:1-86.
- Ali A, Hoefflich KP, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *J R Chem Rev*. 2001;101(8):2527-40.
- Angst J. Epidemiology of depression. In: Honig A e Van Praag HM. *Depression: neurobiological, psychological and therapeutic advances*. Chichester: John Wiley & Sons; 1997.17-29.
- Angst J, Gamma A, Gastpar M, Lépine JP, Mendlewicz J, Tylee A. Gender differences in depression: epidemiological findings from the European Depres I and II studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2002;252(5):201-9.
- Angst J, Gamma A, Benazzi F, Ajdacic V, Eich D, Rössler W. Toward a re-definition of subthreshold bipolarity: epidemiology and proposed criteria for bipolar – II, minor bipolar disorders and hypomania. *J. Affect disord*. 2003;73(1-2):133-46.
- Anacker C, Zunszain PA, Cattaneo A, Carvalho LA, Garabedian MJ, Thuret S, Price J, Pariante CM. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry*. 2011; 16(7):738-50.
- Avrichir BS, Elkis H. Prevalence and underrecognition of dysthymia among psychiatric outpatients in São Paulo, Brazil. *J Affect Disord*. 2002;69:193-9.
- Bakish D, Cavazzoni P, Chudzik J, Ravindran A, Hrdina PD. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet serotonin parameters in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 1997;41(2):184-90.
- Baldessarini RJ. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: depression and anxiety disorders. Em: Hardman JG, Limbird LE. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10^aed. New York: McGraw-Hill; 2001.447-83.
- Barradas MA, Mikhailidis DP. The use of platelets as models for neurons: possible applications to the investigation of eating disorders. *Biomed & Pharmacother*. 1993;47:11-8.
- Barua A, Ghosh MK, Kar N, Basilio MA. Prevalence of depressive disorders in the elderly. *Annals of Saudi Medicine*. 2011; 31(6):620-4.
- Bayatti N, Zchocke J, Behl C. Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotrophin-releasing hormone in primary neurons. *Endocrinology*. 2003;144:4051-60.

- Benjamin E, Coico R, Sunshine G. *Imunologia*. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
- Beaulieu JM. Not only lithium: regulation of glycogen synthase kinase-3 by antipsychotics and serotonergic drugs. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2007;10:3-6.
- Beaulieu JM, Zhang X, Rodriguiz RM, Sotnikova TD, Cools MJ, Wetsel WC, Gainetdinov RR, Caron MG. Role of GSK3B in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *PNAS*. 2008;105(4):1333-8.
- Bibb JA. Decoding dopamine signaling. *Cell*. 2005;122(2):153-5.
- Blardi P, De Lalla A, Leo A, Auteri A, Iapichino S, Di Muro A, Dell'Erba A, Castrogiovanni P. Serotonin and fluoxetine levels in plasma and platelets after fluoxetine treatment in depressive patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2002; 22(2):131-6.
- Blazer DG, Koenig HG. Mood disorders. Em: Busse EW, Blazer DG. *Textbook of Geriatric Psychiatry*. 2ª ed. Washington: American Psychiatric Press; 1996.
- Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, Kilic F. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem*. 2007;102(1):206-15.
- Burke MJ, Preskorn SH. Short term treatment of mood disorders with standard antidepressants. Em: Bloom FE, Kupfer DJ. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven; 1995. 1053-65.
- Bush AI, Tanzi RE. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid β precursor protein isoforms in the platelet [editorial]. *Arch Neurol*. 1998;55:1179-80.
- Byers AL, Yaffe K. Depression and risk of developing dementia. *Nat Rev Neurol*. 2011; 7(6):323-31.
- Carici F, Copani A, Nicoletti F, Drago F. Depression and Alzheimer's disease: Neurobiological links and common pharmacological targets. *European Journal of Pharmacology*. 2010;624:64-71.
- Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42:321-32.
- Chin, P. C.; Majdzadeh, N.; D'Mello, S. R.; Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Molecular Brain Research*. 2005;137:193-201.
- Collins CH, Braga GL e Bonato PS. *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas: Editora da UNICAMP; 1997.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000;351(1):95-105.
- Del Porto, J.A. Bipolar disorder: evolution of the concept and current controversies. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004;26(3):3-6.
- Depression. OMS [Internet]. Visto em 03 de maio de 2011. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/index.html
- Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F. Platelets as a peripheral district were to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *European Journal of Pharmacology*. 2000;405:277-83.
- Draper BM, Koschera A. Do older people receive equitable private psychiatric service provision under Medicare? *Australian and New Zealand Journal Of Psychiatry*. 2001;35:626-30.
- Dugo, L.; Collin, M.; Thiernemann, C.; Glycogen synthase kinase 3 β as a target for the therapy of shock and inflammation. *Shock*. 2007;27(2):113-23.

- Dunner DL. Na overview of paroxetine in the elderly. *Gerontology*. 1994; 40(1):21-7.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nat Genet*. 2004;36(2):131-7.
- First, M.B., Spitzer, L. R., Williams, M.G., Janet B.W. Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition. (SCID-I/P). 2002. New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute.
- Fisar Z, Hroudová J. Intracellular Signalling Pathways and Mood Disorders. *Folia Biologica (Praha)*. 2010; 56:135-48.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189-98.
- Forlenza OV, Almeida OP. *Depressão e Demência no Idoso, tratamento psicológico e farmacológico*. 1ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 1997.
- Forlenza OV, Stoppe Júnior A, Hirata ES, Ferreira RCR. Antidepressant efficacy of sertraline and imipramine for the treatment of major depression in elderly outpatients. *Revista Paulista de Medicina*. 2000;118(4):99-104. Revisão
- Forlenza OV. *Psiquiatria Geriátrica - Do Diagnóstico Precoce à Reabilitação*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2007.
- Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HP, Diniz BS, Gattaz WF. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2010;45(2):220-4.
- Gallassi R, Di SR, Morreale A, Amore M. Memory impairment in patients with late-onset major depression: the effect of antidepressant therapy. *J. Affect. Disord*. 2006; 91, 243–250.
- Garrido JJ, Simon D, Varea O, Wandosell F. GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett*. 2007;581:1579-86.
- Gingrich JA, Hen R. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;155:1-10.
- Gould, T. D.; Manji, H. K.; Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1223-37.
- Griffiths J, Ravindran AV, Merali Z, Anisman H. Dysthymia: a review of pharmacological and behavioral factors. *Mol Psychiatry*. 2000;5:242-61.
- Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3B in cellular signalling. *Progress in Neurobiology*. 2001;65:391-426.
- Hall JE, Guyton AC. *Fundamentos de Guyton - Tratado de Fisiologia Médica*, 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 647.
- Hiemke C. Paroxetine: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 1994;62(1):2-8.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 2000;406:86-90.
- Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen Synthase kinase-3. *J. Biol. Chem*. 1997;272:25326-32.
- Johnson EL, Stevenson R. *Basic Liquid Chromatography*. 2ª ed. Palo Alto: Varian Associates; 1978. 2-12 e 242-7.

- Johnson GJ, Leis LA, Dunlop PC, Weir EK. The effect of the anorectic agent, *d*-fenfluramine, and its primary metabolite, *d*-norfenfluramine, on intact human platelet serotonin uptake and efflux. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 2003;1:2663-68.
- Joep RS. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry*. 1999;4(2):117-28. Review.
- Joep RS, Johnson GVW. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences*; 2004. vol 29, n2, 95:106.
- Joep RS, Roh M-S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. *Curr Drug Targets*. 2006;7(11):1421-34.
- Joep RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochem Res*. 2007;32:577-95.
- Kang UG, Seo MS, Roh MS, Kim Y, Yoon SC, Kim YS. The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signaling pathway. *FEBS Lett*. 2004;560(1-3):115-9.
- Kaytor, M. D.; Orr, H. T.; The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurobiology*. 2002;12:275-8.
- Keowkase R, Aboukhatwa M, Luo Y. Fluoxetine protects against amyloid-beta toxicity, in part via daf-16 mediated cell signaling pathway, in *Caenorhabditis elegans*. *Neuropharmacology*. 2010; 59(4-5):358-65. Epub 2010 Apr 24.
- Kessing LV. Cognitive impairment in the euthymic phase of affective disorder. *Psychol. Med*. 1998; 28, 1027–1038.
- Kessing LV, Andersen PK. Does the risk of developing dementia increase with the number of episodes in patients with depressive disorder and in patients with bipolar disorder? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2004; 75, 1662–1666.
- Kessing LV, Søndergård L, Forman JL, Andersen PK. Antidepressants and dementia. *J Affect Disord*. 2009 Sep;117(1-2):24-9.
- Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(16):8455-9.
- Latif ML, Pillay TS. Differential detection of phosphorylated glycogen synthase kinase 3 alpha and beta depending on blocking conditions. *Anal Biochem*. 2008; 379(1):136-7.
- Lee B-H, Kim Y-K. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatric Investig*. 2010; 7:231-5.
- Lee HC, Tsai JN, Liao PY, Lin KY, Chuang CC et al. Glycogen synthase kinase 3 alpha and 3 beta have distinct functions during cardiogenesis of zebrafish embryo. *BMC Dev Bi*. 2007;7:93.
- Lépine JP, Gogger J, Blashko C, Probst C, Moles MF, Kosolowski J, Scharfetter B, Lane RM. A double-blind study of the efficacy and safety of sertraline and clomipramine in outpatients with severe major depression". *International Clinical Psychopharmacology* . 2000;15(5):263-71.
- Leonard BE. Inflammation, depression and dementia: are they connected? *Neurochem. Res*. 2007; 32, 1749–1756.
- Lewis JA, Tierney CM, Fisher HR, Zoritto LM, Snow GW, Reid WD et al. Pathologic diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1988;38:1660.
- Li G, Iyengar R. Calpain as an effector of the Gq signaling pathway for inhibition of Wnt/beta -catenin-regulated cell proliferation. *Proc Natl Sci USA*. 2002;99(20):13254-9.

- Li X, Friedman AB, Zhu W, Wang L, Boswell S, May RS et al. Lithium regulates glycogen Synthase kinase-3beta in human peripheral blood mononuclear cells: implication in the treatment of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2007;61:216-22.
- Li X, Rosborough KM, Friedman AB, Zhu W, Roth KA. Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2007; 10: 7-19.
- Li X, Zhu W, Roh M-S, Friedman AB, Rosborough K, Jope RS. *In vivo* Regulation by Glycogen Synthase Kinase-3B (GSK3B) by Serotonergic Activity in Mouse Brain. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29: 1426-1431.
- Licinio J, Wong W-L. *Biology of Depression from Novel Insights to Therapeutic Strategies*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha.
- Lima CAM, Baumann P, Eap CB. Concentrações plasmáticas de paroxetina em pacientes adultos e idosos com depressão. *Ver Psiquiatr RS*. 2008; 30(1):13-18.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951, 193(1):265-75.
- Maes M. Major depression and activation of the inflammatory response. *Adv. Exp. Biol. Med*. 1999; 461, 25–46.
- Mai L, Jope RS, Li X. BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. *J Neurochem*. 2002;82:78-83.
- Markou T, Cullingford TE, Giraldo A, Weiss SC, Alsafi A, Fuller SJ et al. Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta in cardiac myocytes: regulation and consequences of their inhibition. *Cell Signal*. 2008;20:206-18.
- Markowitz JC, Kocsis JH, Bleiberg KL, Christos PJ, Sacks M. A comparative trial of psychotherapy and pharmacotherapy for "pure" dysthymic patients. *J Affect Disord*. 2005;89(1-3):167-75.
- Masi G, Brovedani P. The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression. *CNS Drugs*. 2011 Nov 1;25(11):913-31.
- Mendes CT, Mury FB, de Sá Moreira E, Alberto FL, Forlenza OV, Dias-Neto E, Gattaz WF. Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2009; 259(1):16-22.
- Middlemiss DN, Price GW, Watson JM. Serotonergic targets in depression. *Current Opinion in Pharmacology*. 2002;2:18-22.
- Moreno DH, Soares MBM. *Diagnóstico e Tratamento: Elementos de Apoio – Depressão*. 1ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2003.
- Moreno RA, Moreno DH. A relação entre outros quadros psiquiátricos e distímia. *Em*: Cordás TA, Nardi AE, Moreno RA, Castel S. *Distímia – do mau humor ao mal do humor*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. 42-52.
- Muijsers RB, Plosker GL, Noble S. Sertraline: a review of its use in the management of major depressive disorder in elderly patients. *Drugs & Aging*. 2002;19(5):377-92.
- Muliyala KP, Varghese M. The complex relationship between depression and dementia. *Ann Indian Acad Neurol*. 2010;13(2):69-73.
- Nardi AE. Estudo epidemiológico em distímia. *J Brás Med*. 1999;77(1):85-96.

- Neuger J, Wistedt B, Sinner B, Aberg-Wistedt A, Stain-Malmgren R. The effect of citalopram treatment on platelet serotonin function in panic disorders. *Int Clin Psychopharmacol*. 2000;15(2):83-91
- Nunes, P.V.; Forlenza, O.V.; Gattaz, W.F.; Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2007;190:359-60.
- Owens MJ, Nemeroff CB. The serotonin transporter and depression. *Depression and Anxiety*. 1998;8(1):5-12.
- O'Brien WT, Klein PS. Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 in Patients with Affective Disorders. *Biol Psychiatry*. 2007;61:139-41.
- Padovani, A. et al; Amyloid precursor protein in platelets. A peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD. *Neurology*. 2001;57:2243-8.
- Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL. The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *British Journal of Pharmacology*; 2008;153:428-37.
- Peng ZW, Xue YY, Wang HN, Wang HH, Xue F, Kuang F, Wang BR, Chen YC, Zhang LY, Tan QR. Sertraline promotes hippocampus-derived neural stem cells differentiating into neurons but not glia and attenuates LPS-induced cellular damage. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012 Jan 10;36(1):183-8. Epub 2011 Aug 25.
- Peterson, G.L.; Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*. 1979;100(2):201-20.
- Pinho, MX; Custódio, O; Makdisse M. Incidência de depressão e fatores associados em idosos residentes na comunidade: revisão de literatura. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol*. 2009 ; 12(1): 123-140.
- Planel, E.; Sun, X.; Takashima, A.; Role of GSK-3 β in Alzheimer's disease pathology. *Drug development research*. 2002;56:491-510.
- Polter AM, Li X. 5-HT_{1A} receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signalling*. 2010;22:1406-12.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. Tradução da 5ª edição americana. São Paulo: Elsevier; 2003. 524-619.
- Ravindran AV, Anisman H, Merali Z, Charbonneau Y, Telner J, Bialik RJ, Wiens A, Ellis J, Griffiths J. Treatment of primary dysthymia with group cognitive therapy and pharmacotherapy: clinical symptoms and functional impairments. *Am J Psychiatry* 1999; 156(10):1608-17.
- Ravindran AV, Gueffi JD, Lane RM, Cassano GB. Treatment of dysthymia with sertraline: a double-blind, placebo-controlled trial in dysthymic patients without major depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2000;61(11):821-7.
- Rayassam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen Syntase Kinase 3: more than a namesake. *British Journal of Pharmacology*. 2009;156:885-98.
- Roggenbach J, Müller-Oerlinghausen B, Franke L, Uebelhack R, Blank S, Ahrens B. Peripheral serotonergic markers in acutely suicidal patients. 1. Comparision of serotonergic platelet measures between suicidal individuals, nonsuicidal patients with major depression and healthy subjects. *Journal of Neural Transmission*. 2007;114:479-87.
- Rojo LE, Fernández JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res*. 2008; 39, 1–16.
- Ros LT. La evaluación de los efectos terapêuticos de Paroxetina em el síndrome depresivo endógeno. *Archivos Venezolanos de Farmacologia y Terapêutica*. 2006;25(2):72-7.

- Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, et al. CAMDEX: A Standardized Instrument for the Diagnosis of Mental Disorders in the Elderly with Special Reference to Early Detection of Dementia. *Br J Psychiatry*. 1986;149:698-709.
- Ryder J, Su Y, Liu F, Li B, Zhou Y, Ni B. Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312:922-9.
- Scalco MZ. Tratamento de idosos com depressão utilizando tricíclicos, IMAO, ISRS e outros antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2002;24(1):55-63.
- Seeman P, Schwarz J, Chen JF, Szechtman H, Perreault M, McKnight GS, Roder JC, Quirion R, Boksa P, Srivastava LK, Yanai K, Weinshenker D, Sumiyoshi T. Psychosis pathways converge via D2 (high) dopamine receptors. *Synapse*. 2006;60(4):319-46.
- Stahl SM. *Psicofarmacologia Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
- Stambolic V, Ruel L, Wooget J. Lithium inhibits glycogen Synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cell. *Curr Biol*. 1996;6:1664-8.
- Stella F, Gobbi S, Corazza DI, Costa JLR. Depressão no idoso: diagnóstico, tratamento e benefícios da atividade física. *Motriz*. 2002;8(3):91-8.
- Su Y, Ryder J, Li B, Wu X, Fox N, Solenberg P, Brune K, Paul S, Zhou Y, Liu F, Ni B. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry*. 2004;43:6899-908.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase 1 is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;90:7789-93.
- Thase ME, Fava M, Halbreich U, Kocsis JH, Koran L, Davidson J, Rosenbaum J, Harrison W. A placebo-controlled, randomized clinical trial comparing sertraline and imipramine for the treatment of dysthymia. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1996;53(9):777-84.
- Tsai S-J, Liou Y-J, Hong C-J, Yu YW-Y, Chen T-J. Glycogen Synthase kinase-3 β gene is associated with antidepressant treatment response in Chinese major depressive disorder. *The pharmacogenomics journal*. 2008;8(6):384-90.
- Turner EH, Matthews AM, Linardatos E, Tell RA, Rosenthal R. Selective publication of antidepressant trials and its influence on apparent efficacy. *N. Engl. J. Med*. 2008;358(3):252-60.
- Urani A, Chourbaji S, Gass P. Mutant mouse models of depression: Candidate genes and current mouse lines. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2005;29:805-28.
- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lellouch J, Lépine JP, Newman SC, Rubio-Stipec M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen H, Yeh EK. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA*. 1996;276(4):293-9.
- Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J*. 1990;9(8):2431-8.
- Woodgett JR. cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods Enzymol*. 1991;200:564-77.
- Woodgett JR. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE*. 2001;100:re12.
- Yatham LN, Steiner M. Neuroendocrine probes of serotonergic function: a critical review. *Life Sciences*; 1993;53:447-63.

Zainaghi IA, Forlenza OV, Gattaz WF. Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. *Psychopharmacology*. 2007;192 547-53.

ANEXO A – Soluções utilizadas

- Ácido perclórico (HClO_4) 3,4M.
- Tampão fosfato de sódio diácido ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma) 0,1M, pH 3,0 (para fase móvel).
- Fase móvel: Tampão fosfato de sódio diácido + SDS (10uM): Acetonitrila: Metanol (70:15:15 v/v/v).
- Tampão fosfato de sódio (Na_2PO_4) 30mM/L, pH 7,4 (para diluir o padrão de 5-HT).
- EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,09 M.
- Tris 10 mM.
- Tampão de lise de plaquetas: 0,152 g Tris-HCl, 10 mM, pH 7,4; 0,038 g EGTA (ácido tetraacético do glicol de etileno).
- PMSF (do inglês phenylmethylsulfonylfluoride).
- ACD-NH: Glicose 124 mM, citrato de sódio dihidratado 84 mM, ácido cítrico 41 mM.
- Solução de lavagem de plaquetas: Citrato de sódio 0,1 M, KCl 0,155 M, MgCl_2 0,1 M, glicose 0,33 M, CaCl_2 0,1 M, albumina 200 mg/mL, NaCl 0,9% e apyrase 2 U/mL.
- Tris – sacarose: Tris-HCL 50 mM pH = 7,4, sacarose 233 mM.
- Tampão de amostra (*Laemmli Buffer*): Tris 0,8 M, Mercaptoetanol 12%, glicerol 10%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,2%.

- Gel de poliacrilamida para corrida a 12%: 5,9 mL de água, 5 mL de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8), 3,8 mL de Tris 1 M pH=8,8, 150 µL de SDS 10%, 150 µL de persulfato de amônia e 15 µL de temed.
- Gel de poliacrilamida para acomodação a 3%: 3,9 mL de água, 600 µL de Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8), 1,5 mL de Tris 1 M pH=6,8, 60 µL de SDS 10%, 60 µL de persulfato de amônia e 10 µL de temed.
- Tampão de corrida: Tris 25 mM, glicina 160 mM, SDS 10% (m/v).
- Tampão de transferência: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (m/v).
- TBS 10X: Tris 250 mM, NaCl 1,4 M, KCl 50 mM.

ANEXO B – Padronização de *western blotting* e *immunoblotting*

A) Padronização de *Western blot*

Foram testadas duas concentrações de proteína/volume: 20 ug/uL e 25 ug/uL. Após a determinação da concentração das proteínas, as amostras foram diluídas com ‘tampão de amostra’ (*Laemmli buffer*) a fim de atingir concentrações ideais para o *western blot*.

A partir da concentração de proteínas em cada amostra, calculou-se o volume necessário para que fossem aplicados 20 µg de proteínas totais, diminuindo assim possíveis erros de corrida e interpretação de resultados. Foi selecionado um marcador molecular cujos pesos são: 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa (*Low molecular weight calibration kit for eletrophoresis* - Amersham); visto que o peso molecular da GSK3B é 46 kDa .

Foi preparado um *pool* de amostras de plaquetas de indivíduos sadios que foi aliquoteado e armazenado a – 80 °C, a fim de servir como um padrão interno (Pi) do experimento. Em cada gel foi aplicado este Pi em triplicata, sendo utilizado para corrigir variações analíticas entre os dias de análise.

Antes da aplicação das amostras no gel de 12% de acrilamida, as alíquotas foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos em banho seco (*DRI-BLOCK DB-3*, Techne) para desnaturar as proteínas, desenovelando-as completamente, a fim de facilitar a separação das mesmas durante a corrida eletroforética.

A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida por 90 minutos a 150 V. Durante o tempo da eletroforese, as membranas de nitrocelulose, as folhas de papel-filtro e as “esponjas” (*fiber pads* – Bio-Rad), necessárias para a transferência, permaneceram imersas no tampão de transferência para melhor resolução do método. Terminada a eletroforese, cada membrana de nitrocelulose foi colocada em contato com o gel a ser analisado, e o conjunto foi acondicionado entre os papéis-filtro, e estes, entre as esponjas do sistema de transferência que ocorreu por 90 minutos a 250 mA. Tanto para a realização da corrida de eletroforese como também da transferência das proteínas, foi utilizado o sistema de mini-géis verticais *Mini-Protean III* (Bio-Rad).

Levando-se em consideração o peso molecular das proteínas a serem analisadas, utilizamos um gel com 12% de acrilamida. Substituindo a concentração anteriormente utilizada (10%), obtivemos uma melhor resolução das bandas. As outras variáveis não foram modificadas. A corrida eletroforética foi realizada por 90 minutos a 150 V. Para a transferência foram necessários 60 minutos a 250 mA.

B) Padronização de Immunoblotting

Para a otimização do método foram testadas diversas condições nas diferentes etapas do experimento para cada uma das proteínas a serem analisadas: GSKT (Tabela 4) e pGSK (Tabela 5).

Tabela 7 - Testes feitos para revelação da GSKT.

Condição Etapa do experimento	Concentração	Tempo	Diluyente	
Bloqueio	3% leite 5% leite 8% leite 1% BSA 3% BSA	1 hora 5 horas <i>Over night</i>	TBS1x TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	
Anticorpo primário	1:200 1:400 1:500 1:600 1:750 1:800 1:1000 1:2000 1:3000	1 hora 2 horas <i>Over night</i>	TBS1x TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	3% leite 5% leite 8% leite 3% BSA
Anticorpo secundário	1:200 1:300 1:400 1:3000 1:10000	1 hora	TBS1x TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	5% leite 3% BSA
Conjugado	1:3000	1 hora	TBS-Tween 0,2%	
Lavagens	TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	4 x 5' 3x5' + 3x15' + 1x15' 4x5' + 1x H2O MilliQ	-	

Tabela 8 - Testes feitos para revelação da pGSK.

Condição Etapa do experimento	Concentração	Tempo	Diluyente	
Bloqueio	5% leite 1% BSA 3% BSA	1 hora	TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	
Anticorpo primário	1:600 1:5000 1:7000 1:8000 1:10000 1:12000 1:14000	<i>Over night</i>	TBS1x TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	3% leite 5% leite 1% BSA 3% BSA
Anticorpo secundário	1:400 1:10000 1:15000	1 hora 2 horas	TBS1x TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	5% leite 1% BSA 3% BSA
Conjugado	1:3000	1 hora	TBS-Tween 0,2%	
Lavagens	TBS-Tween 0,01% TBS-Tween 0,2%	4 x 5' 3x5' + 3x15' + 1x15' 4x5' + 1x H2O MilliQ	-	

Além de condições distintas foram também testados alguns anticorpos:

- Anti-GSK3B: Sigma G6414; Abcam ab73173.
- Anti-pGSK3Bser9: Santa Cruz sc-11757; Abcam ab9769.
- Anti-mouse: Sigma A4416; GE Healthcare RPN1001V1; Calbiochem 401215.
- Anti-rabbit: GE Healthcare RPN1004V1; Abcam ab16284.

As lavagens foram realizadas em agitador do tipo *Roto Mix* – 50800 (Barnstead/Thermolyne). Para o bloqueio e as incubações com os anticorpos foi utilizado o agitador *Platform Vari Mix*, (Barnstead/Thermolyne). A revelação ocorreu dentro do equipamento de imagem *ChemiimagerTM 4000* (Alpha Innotech, *Multimage Light Cabinet*). Sobre a membrana foi adicionado o reagente ECL que, após reagir por 15 minutos com a peroxidase, emitiu luz que foi captada pelo equipamento de imagem.

Usando um software específico, a imagem foi salva no computador. Em seguida foi realizada a densitometria das bandas encontradas, ou seja, a contagem de *pixels* da imagem descontando o *background*. O valor da densitometria foi obtido com a seleção das bandas, realizada por ferramentas do software, onde foi possível delimitar um retângulo ao redor das bandas e excluir *background*. Este retângulo, durante todo o estudo teve a mesma área. Para diminuir os erros o *zoom* da câmera de captação foi mantido o mesmo para todas as análises. A média da duplicata de cada amostra foi dividida pela média da triplicata do Pi, corrigindo possíveis variações durante o experimento.

Protocolo estabelecido

- GSKT

As membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% de leite desnatado em TBS-Tween 0,2% *over night* (16 h a 18 h) sob agitação a 4 °C a fim de se evitar interações inespecíficas do anticorpo primário. Após esta incubação as membranas foram lavadas 4 vezes por 5 minutos com TBS-

Tween 0,2% e a seguir foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação com o anticorpo primário diluído 1:3000 em TBS-Tween 0,2% (G6414, Sigma Aldrich) que reconhece apenas a isoforma beta da proteína (GSK3B). Após esta incubação de 1 hora, as membranas foram lavadas 4 vezes por 5 minutos com TBS-Tween 0,2%. A seguir as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário diluído 1:400 em TBS 1x (anti-mouse IgG – conjugado a peroxidase, Sigma Aldrich) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Após esta última incubação as membranas passaram por mais um ciclo de 4 lavagens de 5 minutos cada e foram então reveladas e a densitometria das bandas foi realizada (Figura 7). As lavagens foram feitas em agitador do tipo *Roto Mix* – 50800 (Barnstead/Thermolyne).

Figura 8 - Blot para a enzima GSKT.

- pGSK

As membranas foram bloqueadas com 1% BSA em TBS-Tween 0,01% por 1 hora a temperatura ambiente a fim de se evitar interações inespecíficas do anticorpo primário. Após esta incubação as membranas foram lavadas 4 vezes por 5 minutos com TBS-Tween 0,01% e a seguir foram incubadas *overnight* (16h a 18h) à temperatura de 4 °C sob agitação com o anticorpo primário (ab9769, Abcam) diluído 1:5000 em TBS-Tween 0,01% que reconhece apenas

a isoforma fosforilada na porção ser9 da proteína GSK3B. Após esta incubação as membranas foram lavadas 4 vezes por 5 minutos TBS-Tween 0,01%. As membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação com o anticorpo secundário diluído 1:10000 em TBS 1x (anti-rabbit IgG, GE Healthcare). Após esta última incubação as membranas passaram por mais um ciclo de 4 lavagens de 5 minutos e foram então reveladas e a densitometria das bandas foi realizada (Figura 8). As lavagens foram realizadas em agitador do tipo *Roto Mix* – 50800 (Barnstead/Thermolyne).

Figura 9 - Blot para a enzima pGSK.

C) Análise das amostras

Foram analisadas 82 amostras de plaquetas (visita 1, 2 e 3) tanto para a determinação de GSKT quanto para pGSK por *blotting*. As amostras analisadas não apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 7) nem para a quantificação da enzima GSKT nem da pGSK (Figura 9) e, conseqüentemente, a rGSK (Figura 10).

Tabela 9 - Médias e desvios padrão de GSKT, pGSK e rGSK nas visitas 1, 2 e 3.

GSK3B (valores densitométricos)	V1 (n= 36)	V2 (n= 30)	V3 (n= 16)	p
GSKT (média ± dp)	1,17 (0,36)	1,13 (0,33)	1,15 (0,32)	0,924
pGSK (média ± dp)	0,95 (0,36)	0,99 (0,49)	0,95 (0,24)	0,914
rGSK (média ± dp)	0,85 (0,30)	0,89 (0,38)	0,82 (0,28)	0,831

Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento; GSKT: GSK3B total; pGSK: GSK3B fosforilada; rGSK: pGSK/GSKT.

Figura 10 - Comparação da enzima GSKT e da enzima pGSK por blotting. Utilizou-se ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0,05$. Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento.

Figura 11 - Comparação da rGSK por blotting nas 3 visitas. Utilizou-se ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0,05$. Sendo que V1= pré-tratamento; V2= 3 meses de tratamento, V3= 12 meses de tratamento.

APÊNDICE A – Aprovação do Comitê de Ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0847/09**, intitulado: "**DETERMINAÇÃO RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS SEROTONÉRGICOS E INIBIÇÃO DA ENZIMA GSK3B EM PACIENTES IDOSOS COM TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR**", apresentado pelo Departamento de **PSIQUIATRIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. WAGNER FARID GATTAZ**

Pesquisador (a) Executante: **HELENA PASSARELLI GIROUD JOAQUIM**

CAPPesq, 04 de Novembro de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

recebido
06/11/2009
TH

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

matc

APÊNDICE B – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO: CIDADE

CEP:.....TELEFONE:(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:Nº.....APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE:DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS SEROTONÉRGICOS E INIBIÇÃO DA ENZIMA GSK3B EM PACIENTES IDOSOS COM TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

2. PESQUISADOR : Wagner Farid Gattaz

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular/ Psiquiatra

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 25.956

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Psiquiatria

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(X) RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO

() RISCO BAIXO () RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Justificativa e objetivos da pesquisa – Investigações internacionais realizadas na última década têm relacionado alterações biológicas em pacientes com transtorno depressivo. Dentre estas foram detectadas alterações bioquímicas possivelmente relacionadas com o risco para a doença. O presente estudo tem como objetivo investigar tais alterações em indivíduos portadores de transtorno depressivo maior. O objetivo principal do projeto é comprovar alguns parâmetros bioquímicos nesses pacientes antes e após o início do tratamento com antidepressivos.

2 – Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais – Se você decidir participar, deverá ser preenchida uma ficha de histórico e avaliação clínica (psiquiátrica e cognitiva) e será feita uma coleta de 10-40 mL (equivalente a 3 colheres de sopa) de sangue por punção periférica da veia do antebraço. As amostras serão utilizadas para as determinações bioquímicas. Todo material será codificado de modo que a identidade dos participantes não seja revelada.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Desconfortos e riscos esperados – Os desconfortos e riscos esperados são mínimos e são decorrentes apenas do processo da coleta de sangue. Você poderá apresentar dor, desconforto ou hematoma quando o sangue for retirado.

5 – Benefícios que poderão ser obtidos – Não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a existência de variantes bioquímicas associadas à depressão. É possível, mas não garantido, que os pacientes com este transtorno possam ser beneficiados pelos resultados deste estudo no futuro, bem como seus familiares. O estudo visa maior esclarecimento dos mecanismos biológicos responsáveis pelo aparecimento da depressão. De posse destes conhecimentos, espera-se conseguir, no futuro, melhores estratégias para o tratamento do referido transtorno.

6 – Garantia de acesso - em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Wagner Farid Gattz que pode ser encontrado no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, 785, São Paulo – SP. Telefone 3069-8010. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Relação entre níveis serotoninérgicos e inibição da enzima gsk3b em pacientes idosos com transtorno depressivo maior”**.

Eu discuti com o Dr. Wagner Farid Gattaz sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____