SAMUEL BRAGA DE ANDRADE

**Tractografia de substância branca em portadores de transtorno afetivo
bipolar e relação com biomarcadores de sangue periférico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Mestre em Ciências
Programa de Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Samuel Braga de
Tractografia de substância branca em portadores
de transtorno afetivo bipolar e relação com
biomarcadores de sangue periférico / Samuel Braga
de Andrade. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.
Orientador: Geraldo Busatto Filho.

Descritores: 1.Transtorno bipolar 2.Substância
branca 3.Imagem de tensor de difusão
4.Biomarcadores 5.Neurotrofinas 6.Glicogênio
sintase quinase 3 beta

USP/FM/DBD-285/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha família

Que nunca deixou de acreditar nos meus sonhos e nunca mediram esforços
para que os mesmos fossem realizados. Os levo sempre comigo em meu
coração.

“Todos os dias deveríamos ouvir
um pouco de música, ler uma boa
poesia, ver um quadro bonito e, se
possível, dizer algumas palavras
sensatas.”

Johann Wolfgang von Goethe

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar meus caminhos e nunca me desamparar nos momentos mais difíceis da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho pela confiança, paciência e por me dar a satisfação em ser seu aluno.

Aos meus pais, Paulo e Ivanete, por sempre terem me amado e me encorajado a seguir meus sonhos e permanecer verdadeiro a quem sou. Não poderia ter pais melhores. Muito Obrigado!

Ao meu irmão Rafael, que sempre esteve ao meu lado, sempre me protegeu e por sempre ter se mostrado um exemplo de ser humano para mim. Obrigado por me apoiar e auxiliar nos meus projetos de vida.

À minha sobrinha Rafaela, que mesmo em seu primeiro ano de vida, foi capaz de somar alegria e amor à vida de minha família.

À minha falecida avó materna, Elvira, por ter se mostrado resiliente às adversidades da vida e ter sido exemplo para seus filhos, netos e bisnetos.

Aos meus amigos, que me deram forças e foram extremamente pacientes comigo durante essa árdua jornada do mestrado e nunca me deixaram perder a confiança em mim mesmo. A todos vocês, o meu muito obrigado.

A todos do LIM-21 muito obrigado por todos esses anos de companheirismo e amizade. Muitas risadas, lágrimas, anseios e sonhos foram compartilhados desde 2014. Levo-os comigo por onde eu for.

À Isabel Ataíde e Eliza Fukushima, por estarem abertas a ouvirem meus anseios, dramas e também por acreditarem que eu conseguiria vencer essa etapa da minha vida. Muitíssimo obrigado!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Transtorno Afetivo Bipolar	23
1.2. Neuroimagem – Imagem por tensor de difusão	24
1.3. Tractografia	27
1.4. Método de análise de DTI: TRACULA	29
1.5. Achados de DTI em pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar	31
1.6. BIOMARCADORES DE TAB NO SANGUE PERIFÉRICO	34
1.6.1. Fatores Neurotróficos	35
1.6.1.1. Fator neurotrófico derivado do cérebro	36
1.6.1.2. Fator neurotrófico derivado da glia	38
1.6.2. Glicogênio-sintase quinase – 3 – β	39
2. OBJETIVO	41
3. HIPOTÊSES	42
4. MÉTODOS	43
4.1. Amostra 43	
4.1.1. Triagem 43	
4.1.2. Critérios de inclusão	44
4.1.3. Critérios de exclusão	45
4.2. Desenho do Estudo	46

4.3. Aquisição das imagens de Ressonância Magnética	46
4.4. Processamento das imagens cerebrais de Ressonância Magnética:.....	47
4.4.1. Processamento das imagens T1	48
4.4.2. Reconstrução automatizada cortical e subcortical das imagens T1	48
4.4.3. Processamento de imagens DWI – TRACULA.....	50
4.5. Controle de Qualidade	52
4.6. Dosagem dos biomarcadores no Sangue Periférico.....	55
4.6.1. Coleta do sangue periférico e preparo de plaquetas.....	55
4.6.2. Análise dos fatores neurotróficos (BDNF e GDNF)	56
4.6.3. Expressão de GSK3- β em plaquetas e determinação indireta da atividade enzimática.....	57
4.7. Análise Estatística	59
4.8. Aspectos Éticos.....	60
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Descrição da Amostra: Dados Demográficos e Clínicos.....	61
5.2. Comparação dos tratos de SB entre grupos	62
5.3. Comparação entre Grupos de Biomarcadores no Sangue Periférico	64
5.4. Correlação entre alteração de Substância Branca e Biomarcadores do Sangue Periférico.....	66
6. DISCUSSÃO	69
6.1. Alterações de DTI.....	69
6.2. Neurotrofinas no Transtorno Afetivo Bipolar	71
6.3. Correlação entre Neurotrofinas e alteração de DTI	73
6.4. Enzima GSK3- β no Transtorno Afetivo Bipolar.....	74
6.5. Correlação entre GSK3- β e Alteração de DTI.....	75

6.6. Considerações Metodológicas	76
7. CONCLUSÃO	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TAB – Transtorno afetivo bipolar;

TAB I/II – Transtorno afetivo bipolar – tipo I/II;

RM – Ressonância Magnética;

DWI – *Diffusion Weighted Imaging* – Imagem Ponderada em Difusão;

SB – Substância Branca;

DTI – *Diffusion Tensor Imaging* – Imagem por Tensor de Difusão;

FA – *Fractional Anisotropy* – Anisotropia fracional;

RD – *Radial Diffusivity* – Difusividade Radial;

AD – *Axial Diffusivity* – Difusividade Axial;

MD – *Mean Diffusivity* – Difusividade Média;

ROI – *Region of Interest* – Região de Interesse;

TRACULA – *Tracts Constrained by Underlying Anatomy* – Tratos Restritos pela Anatomia Subjacente;

UNC – *Uncinate Fasciculus* – Fascículo Uncinado;

ATR – *Anterior Thalamic Radiation* – Radiação Talâmica Anterior;

CCG – *Cingulum Bundle* – Cíngulo;

BDNF - *Brain-derived Neurotrophic Factor* - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro;

GDNF - *Glial-derived Neurotrophic Factor* - Fator Neurotrófico Derivado da Glia;

Trk – Receptor de Tirosina Quinase;

MAPK – Proteína Quinase Ativadas por Mitógenos;

PI-3K – Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase;

Akt – Proteína Quinase B;

GSK3 - *Glycogen-Synthase Kinase 3* - Glicogênio-Sintase Quinase 3;

T-GSK3- β - *Glycogen-Synthase Kinase 3 – β Total* - Glicogênio-Sintase Quinase 3 – β total;

P-GSK3- β - *Glycogen-Synthase Kinase 3 – β Phosphorilated* - Glicogênio-Sintase Quinase 3 – β Fosforilada;

PLCy – Fosfolipase Cy;

PKC – Proteína Quinase C;

CaMK – Proteína Quinase Dependente de Calmodulina;

mRNA – Messenger Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico mensageiro;

GABA – Ácido Aminobutírico;

Wnt – 1 – *Wingless-type MMTV integration site family, member 1*

CS – Controles Saudáveis;

HC – Hospital das Clínicas;

SCID – Structured Clinical Interview for DSM-IV;

LIM-21 – Laboratório de Investigação Médica;

Autorecon – *Automatic Reconstruction* – Reconstrução Automatizada;

ENIGMA – *The Enhancing Neuro Imaging Genetics Through Meta-Analysis*

CAPPEsq – Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DSM-IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- 4* – Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais – 4 4ª Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PBS – Tampão Fosfato

SPSS– *Statistical Package for Social Science* – Pacote Estatístico para Ciência Social.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Controle de Qualidade – tratos excluídos	54
Tabela 2: Informações demográficas e clínicas para pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) e controles saudáveis (CS).....	62
Tabela 3: Valores médios de FA e diferenças entre pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) e controle saudável (CS).....	63
Tabela 4: Valores médios de concentração de neurotrofinas (BDNF e GDNF), expressão plaquetária da GSK3- β e diferenças entre pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) e controle saudável (CS)	65
Tabela 5: Análise de correlação de Pearson entre valores médios de FA dos tratos UNC e ATR e biomarcadores do sangue periférico - em pacientes com TAB	67
Tabela 6: Análise de correlação de Pearson entre valores médios de FA dos tratos UNC e ATR e biomarcadores do sangue periférico - em controles saudáveis.....	68

LISTA DE FIGURAS

<u>Tabela 1:</u> <u>Controle de Qualidade – tratos excluídos</u>	54
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Parâmetros descritivos de magnitude e orientação da elipsoide 3D.....	26
Figura 2:	Princípio da Tractografia.....	29
Figura 3:	Delimitação Manual de 18 Tratos.....	31
Figura 4:	Reconstrução tractográfica dos tratos de substância branca que conectam a região do córtex pré-frontal às regiões do sistema límbico.....	34

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Protocolo Padrão de reconstrução Automatizada (autorecon).....23

RESUMO

ANDRADE, SB. Tractografia de substância branca em portadores de transtorno afetivo bipolar e relação com biomarcadores de sangue periférico.

[dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2019.

INTRODUÇÃO: O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno que tem como característica alteração na regulação da emoção e tem uma prevalência de 2.4%. Pesquisas em Neuroimagem forneceu informações sobre a circuitaria responsável para a expressão e regulação cognitiva da emoção, abrangendo as subregiões do córtex pré-frontal (PFC), ventromedial (vmPFC) e dorsolateral (dlPFC), e também o sistema límbico. Estudos com DTI demonstram baixa integridade de substância branca (SB) na circuitaria PFC-límbica nos pacientes TAB. Nas últimas décadas, cresceu o interesse de pesquisar o papel de biomarcadores no sangue periférico. Dentre os biomarcadores estudados, as neurotrofinas tal como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) foram avaliados, bem como a enzima glicogênio-sintase quinase 3- β (GSK3- β). **OBJETIVO:** No presente estudo, nosso objetivo foi fornecer informações sobre a integridade de SB nos tratos que interligam o PFC à regiões do sistema límbico, em sujeitos com TAB e investigar possível correlação entre alteração de microestrutura de SB e biomarcadores encontrados no sangue periférico. **MÉTODO:** Dados de DTI de 30 sujeitos com TAB, sem tratamento prévio, e 42 controles saudáveis (CS) foram processados utilizando um método automatizado TRACULA para analisar

diferenças na média de anisotropia fracional (FA) dos tratos pertencentes à circuitaria PFC-límbica (ex. fascículo uncinado (UNC), cíngulo (CCG) e radiações talâmicas anterior (ATR)). Concentrações de BDNF e GDNF, além da expressão de GSK3- β em plaquetas, foram obtidos no sangue periférico, a amostra foi processada e comparada entre os grupos de análise (TAB vs CS). Finalmente, nós investigamos uma possível correlação entre alterações de FA nos tratos de SB que compõem a circuitaria PFC-límbica e biomarcadores do sangue periférico. RESULTADOS: Nós achamos valores baixos significantes para o grupo TAB em dois tratos, chamados de UNC esquerdo ($p = 0.03$) e ATR esquerdo ($p = 0.004$). Não houve diferença significativa entre grupos para os valores de BDNF ($p = 0.168$) e GDNF ($p = 0.457$). Houve diferença significativa entre grupo para GSK3- β total, GSK3- β fosforilada e razão - GSK3- β ($p = 0.008$; $p = 0.006$; $p = 0.001$), respectivamente. Correlações positivas entre BDNF e FA alterado dos tratos esquerdo UNC e esquerdo ATR ($r = 0.73$, $p = 0.01$; $r = 0.46$, $p = 0.05$), respectivamente. Não houve correlação significativa entre os dados de FA com alteração de SB e GDNF, GSK3- β total, GSK3- β fosforilada e razão - GSK3- β . CONCLUSÃO: Nosso estudo indica que em uma amostra jovem de TAB, sem tratamento prévio, há uma alteração na integridade dos tratos de SB para a circuitaria PFC-límbica esquerda. Embora níveis de GDNF e atividade de GSK3- β não se correlacionaram de forma significativa com as alterações de integridade dos tratos de SB que compõem a circuitaria PFC-límbica, nós fomos capazes de demonstrar pela primeira vez uma correlação significativa entre dados com alteração de DTI e níveis de BDNF no sangue periférico, numa amostra TAB, sem tratamento prévio. Se confirmado em outros estudos, esses

achados poderiam aumentar o entendimento do papel biológico do BDNF em transtornos do humor e seus mecanismos neuroprotetores de tratos de SB.

Descritores: Transtorno bipolar; Substância branca; Imagem de tensor de difusão; Biomarcadores; Neurotrofinas; Glicogênio sintase quinase 3 beta.

ABSTRACT

ANDRADE, SB. White matter tractography in a bipolar disorder sample and relationship with biomarkers in peripheral blood. **[dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2019.**

Introduction: Bipolar disorder (BD) is a mental disorder that features disturbance in emotion regulation and has a prevalence of 2.4%. Neuroimaging research have provided invaluable information on the brain circuitry responsible for the expression and cognitive regulation of emotion, encompassing the ventromedial (vmPFC) and dorsolateral (dlPFC) subregions of the prefrontal cortex (PFC) and the limbic system. DTI studies have demonstrated low integrity of white matter (WM) in the PFC-limbic circuitry in BD patients. In recent years, interest in the role of peripheral biomarkers in BD increased. Among the biomarkers investigated, neurotrophin such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell-derived neurotrophic factor have been evaluated, as well as the enzyme glial cell-derived neurotrophic factor 3- β (GSK3 β). Objective: In the present study, we aimed to provide information about white matter (WM) integrity in prefrontal cortex (PFC) and limbic tract pathways in drug-naïve BD patients and to investigate relationship between altered WM PFC-limbic tracts with peripheral blood biomarkers. Method: DTI datasets from thirty drug-naïve BD patients and 42 healthy controls were processed using the automated TRACULA method in order to analyze mean fractional anisotropy (FA) differences in PFC-limbic tracts (i.e. uncinate fasciculus (UNC), cingulum (CCG) and anterior thalamic radiation (ATR)). BDNF, GDNF concentrations and expression of

GSK3 β in platelets in the peripheral blood were measured and compared for both groups. Finally, we investigated significant correlations between FA alterations in PFC-limbic WM tracts and peripheral blood biomarkers. Results: We found significantly lower FA values in the BD group in two tracts, namely the left UNC ($p = 0.03$) and left ATR ($p = 0.004$). There were no significant between-group differences in BDNF levels ($p = 0.168$) and GDNF levels ($p = 0.457$). There was a significant between-group differences in GSK3- β total, GSK3- β phosphorylated and GSK3- β – ratio ($p = 0.008$; $p = 0.006$; $p = 0.001$) respectively. Positive correlations between peripheral blood BDNF and altered mean FA were detected for both the left UNC ($r = 0.73$, $p = 0.01$) and left ATR ($r = 0.46$, $p = 0.05$). No correlation was found between altered mean FA and GDNF, T-GSK3 β , P-GSK3- β or GSK3- β – ratio, for TAB group. Conclusion: Our study indicates that drug-naïve BD patients have altered WM tract integrity in the left PFC-limbic circuitry. Although GDNF levels and GSK3- β activity did not correlate to altered WM, we demonstrated for the first time, to the best of our knowledge, a significant correlation between DTI abnormalities and BDNF levels in a drug-naïve BD sample. If confirmed in further studies, these findings may increase understanding of the biological role of BDNF in affective disorders and its neuroprotective mechanisms onto WM tracts.

Descriptors: Mood disorders, bipolar disorder, drug-naïve, white matter, diffusion tensor imaging, tractography, biomarkers, neurotrophins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno Afetivo Bipolar

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno do humor caracterizado pela presença de alterações na regulação da emoção (Radaelli et al., 2015). Segundo os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), o TAB é classificado como parte dos transtornos do Eixo I e caracterizado por episódios de mania e hipomania para TAB tipo-I (TAB-I) e somente hipomania para o TAB tipo-II (TAB-II), bem como episódios proeminentes de depressão para os dois tipos (APA, 2014). O TAB tem idade de início mais comumente na adolescência (com pico entre as idades de 15 e 25 anos) e apresenta, frequentemente, comorbidade com abuso de substâncias, transtornos de ansiedade e transtornos de personalidade, entre outros (Faedda et al., 2015). Trata-se de um transtorno psiquiátrico de curso tipicamente crônico, que em geral compromete de forma significativa o funcionamento social e ocupacional dos indivíduos afetados, além de estar associado a altas taxas de suicídio e mortalidade (Faedda et al., 2015). Dados de diferentes países mostram uma média na prevalência do TAB de 2.4% (Marangoni, Faedda e Baldessarini, 2018), sendo este transtorno classificado em sexto lugar na lista de Carga Global de Morbidade (Global Burden of Disease) (Whiteford et al., 2010).

Segundo o DSM-V, o diagnóstico se baseia na identificação de sintomas de mania ou hipomania e da avaliação do curso da doença, ao longo do tempo (APA, 2014). Contudo, o diagnóstico do TAB é complexo uma vez que o

transtorno é capaz de apresentar similaridades clínicas com outros transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia, principalmente quando acompanhada de sintomas psicóticos (Davila et al., 2006), além dos episódios depressivos confundidos com o transtorno depressivo maior (Brenner et al., 2014).

1.2. Neuroimagem – Imagem por tensor de difusão

Dentre os métodos de aquisição de ressonância magnética (RM), recentemente a técnica de imagem ponderada por difusão (*diffusion-weighted imaging* – DWI) vem se destacando por ampliar os conhecimentos da comunidade científica sobre a anatomia dos tratos de fibras de substância branca (SB) no cérebro humano (Kurumaji et al., 2017). Esse método é capaz de inferir a orientação local das vias de SB em cada voxel (unidade tridimensional das imagens) no encéfalo, que podem estar correlacionadas com a estrutura local dos tratos e sua integridade. O método de difusão pode ser empregado no estudo de transtornos psiquiátricos e outras condições neurológicas incluindo doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, esclerose múltipla, esquizofrenia, autismo, TAB, entre outros (Yendiki, 2011).

A DWI detecta primordialmente a difusão das moléculas de água, a partir do sinal de prótons contido nestas moléculas. O processo de difusão é um reflexo do movimento browniano térmico. Esse processo pode ser explicado utilizando o exemplo de uma gota de tinta de caneta que cai sobre um pedaço de papel e se difunde. Normalmente essa gota se difunde em forma de círculo (distribuição gaussiana) que se expande conforme o tempo. Quanto mais rápido for o processo de difusão, maior será o diâmetro do círculo, e a extensão da difusão

pode então ser estimada por esses parâmetros (Oishi et al., 2008; Mori, Wakana, Nagae-Poetscher e Van Zijl, 2005). No caso em que a extensão da gota é equivalente em todas as direções, a difusão é chamada de isotrópica. Porém, quando o papel possui uma propriedade especial de tecido denso em fibras verticais e escasso em fibras horizontais a gota irá ganhar uma forma de elipsoide, ao longo do eixo vertical. Neste caso, a difusão é chamada de anisotrópica (Jeurissen et al., 2019; Oishi et al., 2008). Essa mesma analogia pode ser aplicada para a difusão que ocorre no encéfalo, em que as moléculas de água possuem uma tendência a se difundir ao longo das fibras axonais. Esse comportamento poderia ser visto se injetássemos tinta na SB. O formato que a distribuição tomaria seria ovalar e alongado, ao longo dos tratos axonais. Porém, na substância cinzenta o processo de difusão se daria de forma mais randomizado, pela falta de estruturas com fibras alinhadas, dando à tinta uma forma mais esférica (Oishi et al., 2008).

O termo imagem por tensor de difusão (*diffusion tensor imaging* – DTI) é atribuído a uma técnica em que a difusão, em DWI, é medida em diversas séries de direções espaciais diferentes usando um equipamento de RM, de forma que a orientação das elipsoides de difusão são determinadas a cada voxel de imagem, ajustando a medida dos resultados obtidos no quadro de referência do aparelho para a elipsoide que descreve a média da arquitetura celular local. Durante os processos de mensuração e de ajuste é utilizado um tensor (uma matriz) de 3×3 , portanto com 9 elementos e que justifica assim o nome imagem por tensor de difusão. Tais elementos são necessários para descrever tanto a magnitude como a orientação de uma elipsoide 3D por meio dos vetores

conhecidos como autovalor (*Eigenvalue*) e autovetor (*Eigenvector*), respectivamente. (Figura 1) (Mori et al., 2005; Oishi et al., 2008).

Adaptado de: Mori e Tournier. (2014).

Figura 1 – Parâmetros descritivos de magnitude e orientação da elipsoide 3D. (A) demonstra uma elipsoide com os Autovalores (*Eigenvalues*) λ_1 , λ_2 e λ_3 que são responsáveis por definirem a forma, enquanto (B) é uma elipsoide que demonstra os três autovetores (*Eigenvectors*) v_1 , v_2 e v_3 , definem são responsáveis por definirem a orientação da elipsoide.

O modelo de tensor de difusão assume que a direção do autovetor principal (v_1) em cada voxel está alinhado com a direção da fibra predominante local (Winston, 2012). Portanto, é correto dizer que o perfil de difusão é regido pela microestrutura tecidual (Pierpaoli e Basser, 1996). Os autovetores podem ser representados pelo campo vetorial ou pela codificação por cores. A

representação feita por meio de um mapa codificado direcionalmente por cor em x (látero-lateral), y (anteroposteriores) e z (supero-inferiores), são demonstrados respectivamente em vermelho, verde e azul (Figura 2) (Oishi et al., 2008; Winston, 2012).

As informações obtidas, tanto dos autovetores como dos autovalores, proporcionam o cálculo de índices que incluem anisotropia fracional (*fractional anisotropy*; FA) e as difusividades radial (*radial diffusivity*; RD), axial (*axial diffusivity*; AD) e média (*mean diffusivity*; MD). FA representa a proporção de difusão de moléculas de água paralelas aos axônios e perpendiculares aos axônios, indicando o índice de conectividade e integridade dos tratos de SB. Este índice é o mais comumente utilizado nos estudos que vislumbram pesquisar mudanças na microestrutura de SB, sendo ele considerado um biomarcador sensível (Kurumaji et al., 2017; Bauer et al., 2015). RD e o AD estimam a difusividade das moléculas de água através e ao longo do axônio, respectivamente. O MD é a combinação linear de AD e RD (Bauer et al., 2015).

1.3. Tractografia

Diversos métodos de processamento de imagens de DTI, sendo um deles a tractografia, foram desenvolvidos (Fitzsimmons, Kubicki e Shenton, 2013), e cada vez mais o estudo dos tratos de SB cerebral tem sido aplicado para a investigação de transtornos mentais (Yoshida, Oishi, Faria, e Mori, 2013; Catani e Thiebaut de Schotten, 2008; Ciccarelli, Catani, Johansen-Berg, Clark, e Thompson, 2008; Smith et al., 2006).

A tractografia é um processamento de imagem pelo qual as conexões de SB são traçadas por meio do campo vetorial (Figura 2) (Jeurissen et al., 2019; Winston, 2012). Os tratos resultantes podem ser usados qualitativamente para planejamentos cirúrgicos ou parâmetros quantitativos podem ser extraídos, tais como número de fibras e avaliação do grau de conectividade entre diferentes regiões do encéfalo (Jeurissen et al., 2019; Winston, 2012). Tal método permite os estudos da anatomia cerebral, desenvolvimento, função e, até mesmo, estudos de conectividade e continuidade dos trajetos das fibras neurais de SB (Jeurissen et al., 2019). A fim de entender como o cérebro opera como um todo, entender apenas quais regiões cerebrais estão ativas não é o suficiente, é necessário também traçar um mapa das conexões físicas que mediam informações entre tais regiões (Jeurissen et al., 2019). Quando se pretende comparar grupos ou realizar correlações entre a integridade de tratos de SB e variáveis clínicas, frequentemente se usa o método de região de interesse (*region of interest* – ROI) para circunscrever as análises a uma região para a qual há uma hipótese *a priori* de envolvimento em um determinado transtorno psiquiátrico ou neurológico, determinando vias anatômicas de construção de tratos a partir dos vetores de cada voxel na ROI escolhida.

Fonte: Winston (2012).

Figura 2 – Princípio de tractografia. Campo vetorial (codificado por cor) contemplando a área do corpo caloso posterior a partir do autovetor principal (v_1). As linhas brancas indicam como os algoritmos da tractografia seguem o campo vetorial. Este campo vetorial está codificado direcionalmente por cores em x (lâtero-lateral), y (anteroposterior) e z (supero-inferior), são demonstrados respectivamente em vermelho, verde e azul.

1.4. Método de análise de DTI: TRACULA

Tratos Restritos pela Anatomia Subjacente (*Tracts Constrained by Underlying Anatomy* – TRACULA) é um método de tractografia por difusão, proposto recentemente para a reconstrução dos tratos de SB. Este método está incluído num dos pacotes de programas computacionais mais utilizados para

processamento de imagens cerebrais, o FreeSurfer (<http://freesurfer.net>). O TRACULA é capaz de reconstruir automaticamente os principais tratos, bilateralmente, de SB (trato córtico-espinhal, fascículo longitudinal inferior, fascículo uncinado (*uncinate fasciculus* - UNC), radiação talâmica anterior (*anterior thalamic radiation* - ATR), cíngulo (cingulum bundle - CCG), fascículo longitudinal superior – regiões parietal e temporal, corpo caloso – regiões do fórceps maior e menor) baseado numa abordagem probabilística e global. A distribuição probabilística é a soma das direções na amostra de todos os voxels, onde a distribuição das orientações, dada a incerteza da estimativa, demonstra voxel a voxel uma direção múltipla. A abordagem global define as duas regiões, de começo e término da via, e procura entre esse espaço todas as possibilidades de conexões que melhor se encaixam no modelo. Este método, probabilístico global, foi sugerido como uma alternativa para identificar tratos de SB específicos, tendo em vista que o algoritmo do TRACULA irá buscar um melhor ajuste dos pontos início e fim do trato de SB a ser estudado. Embora a estratégia probabilística global traga este benefício, acima citado, existe também uma limitação descrita quando tratos de SB, que se cruzam numa mesma região (região de grande incerteza), são estimados. Por haver baixa sensibilidade nestas regiões, o algoritmo possui baixa acurácia na estimativa destas fibras locais (Yendiki, 2011).

Utilizando informações anatômicas de via de tratos previamente obtidas de um grupo de sujeitos teste (cujas vias de SB foram manualmente delimitadas pelos desenvolvedores do software) (Figura 3), o TRACULA combina estas informações com uma segmentação anatômica do mesmo sujeito, com o propósito de derivar a descrição das vias em termos de estruturas que se cruzam

e estruturas que ficam próximas umas das outras. O conhecimento da via anatômica, que é extraído dos sujeitos teste, é usado para iniciar o algoritmo da tractografia probabilística global e também para restringir seu espaço de busca, penalizando conexões que não combinam com o conhecimento anatômico prévio. Isso permite que o algoritmo reconstrua o trato fielmente em um novo sujeito sem intervenção manual, facilitando o processo de análises de grandes amostras e replicação de estudos de portadores de transtornos psiquiátricos e neurológicos (Yendiki, 2011).

Fonte: Yendiki (2011).

Figura 3 – Delimitação manual de 18 tratos. (A) imagem em plano axial e (B) em plano sagital, expondo a delimitação manual de sujeitos teste realizado usando TRACULA. Algumas ROIs foram omitidas, para facilitar a visualização.

1.5. Achados de DTI em pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar

Avanços contemporâneos em pesquisa de neuroimagem forneceram informações inestimáveis sobre a circuitaria cerebral responsável pela expressão e regulação cognitiva da emoção, abrangendo as sub-regiões ventromedial e dorsolateral do córtex pré-frontal (CPF) e sistema límbico (Pinto, Moulin e Amaral, 2017; Strakowski et al., 2012; Adler, DeBello e Strakowski, 2006). Modelos patofisiológicos do TAB, que implicam na alteração de conectividade entre as estruturas CPF-límbico, foram diretamente estimados com a utilização do método de DTI, que permite a avaliação da integridade da microestrutura de SB dos tratos que interconectam tais regiões cerebrais (Bellani et al., 2016). Embora o grande número de publicações de estudos sobre DTI em TAB, até o presente momento, os resultados são heterogêneos, com valores baixo, alto ou mesmo similar de FA em amostra TAB versus controle saudável (Sutubasi et al., 2019; Bellani et al., 2016; Vederine, Wessa, Leboyer e Houenou et al., 2011). Inconsistências nos resultados de estudos de DTI em TAB podem estar relacionados com grande heterogeneidade das amostras (quando levado em consideração os diferentes estados de humor e tipo de TAB) (Brooks et al., 2009), protocolo de aquisição de RM ou protocolo de pós processamento (Bellani e Broybilla, 2011), efeitos de confusão gerados por medicamento (Phillips et al., 2008) ou efeitos provenientes da cronicidade do transtorno em si (Melloni et al., 2019).

Em estudos de tractografia, em amostra com TAB, um grande número de pesquisas têm observado perda de integridade na rede de tratos de SB que conectam ambas as regiões, medial e lateral, do CPF com regiões do sistema límbico, como amígdala e tálamo, sendo esses tratos o UNC, CCG e ATR (Acuff et al., 2019; Ji et al., 2017; Bellani et al., 2016; Benedetti et al., 2011) (Figura 4).

O UNC é um trato de fibras associativas de longo alcance, e suas porções dorsal e temporal conectam as regiões do córtex orbitofrontal e região anterior do lobo temporal, com a amígdala. O CCG, é também um trato de fibras associativas de longo alcance, onde as porções subgenual, rostro-dorsal e temporal (com exceção da porção dorso-caudal) são responsáveis pela conexão das regiões subgenual e dorsal do córtex cingulado anterior, dorsomedial do córtex frontal e lobo medial temporal com a amígdala (Ho et al., 2019). As ATR são tratos de fibras de projeção, que conectam regiões talâmicas ao CPF (Ji et al., 2019).

Apesar do aumento de estudos de DTI em TAB, nos últimos anos, nenhum estudo investigou a microestrutura de SB em sujeitos com TAB sem tratamento prévio utilizando-se um método automatizado de tractografia, até o presente momento.

Figura 4 – Reconstrução tractográfica dos tratos de substância branca que conectam a região do córtex pré-frontal às regiões do sistema límbico. (A), (B) e (C) demonstram os três tratos reconstruídos: radiação talâmica anterior, cíngulo e fascículo uncinado nas cores amarelo, verde e azul, respectivamente. (A) imagem no plano coronal, (B) imagem no plano axial e (C) imagem no plano sagital – lado esquerdo.

1.6. BIOMARCADORES DE TAB NO SANGUE PERIFÉRICO

O acúmulo de conhecimento atual frente ao TAB possibilitou a formulação de possíveis hipóteses biológicas para a identificação de possíveis

biomarcadores para vulnerabilidade, manifestação e curso do transtorno, bem como resposta ao tratamento. Estudos sobre biomarcadores para o TAB estão em constante desenvolvimento e ocorrem em diferentes áreas do conhecimento, como na utilização de diferentes métodos de neuroimagem para estudar mudanças na estrutura e função cerebral e, principalmente, em pesquisas de biomarcadores neuroquímicos no sangue periférico, que têm ganhado interesse na comunidade científica (Sigitova et al., 2017).

1.6.1. Fatores Neurotróficos

Dentre os biomarcadores mais estudados está um grupo de fatores de crescimento chamado de fatores neurotróficos. Esse grupo de fatores são responsáveis por promover a neuroplasticidade, neurogêneses, sobrevivência, diferenciação e por manter a homeostase de grupos celulares cerebrais. Neste grupo estão contidos o fator de crescimento nervoso, neurotrofina 3 e 4, fator neurotrófico ciliar, fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) e fator neurotrófico derivado da glia (*glial cell derived neurotrophic factor* – GDNF). Os receptores neurotróficos são organizados em duas classes: receptor de crescimento nervoso de baixa afinidade (LNGFR, receptor de neurotrofina p75) e a família de receptores quinase de tropomiosina de alta afinidade (receptor de tirosina quinase [Trk]). A cascata de sinalização que ocorre quando o receptor LNGFR é ativado pode culminar na indução de apoptose celular. Já quando os receptores de Trk são ativados ocorre uma sinalização que está correlacionado com o crescimento celular e também com sinais anti-apoptóticos (Sigitova et al., 2017).

As principais vias de sinalização intracelular dos fatores de crescimento incluem: (i) cascata Ras/proteína quinase ativadas por mitógenos (MAPK); (ii) fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (PI-3K)/proteína quinase B (Akt)/cascata glicogênio-sintase quinase-3 (GSK3); e (iii) cascata dos fosfoinosítídeos (fosfolipase C_γ [PLC γ]/proteína quinase C [PKC]) ligada à MAPK, Akt, e/ou Ca^{2+} /proteína quinase dependente de calmodulina (CaMK) (Sigitova et al., 2017; Scola e Andreazza, 2015).

Distúrbios na atividade dos fatores neurotróficos, bem como danos nos mecanismos de regulação da plasticidade e resiliência das células cerebrais já foram reportados no TAB. Grande atenção foi voltada ao BDNF e GDNF por serem neurotrofina encontradas em grande quantidade no cérebro, participarem de importantes cascatas de sinalização e por serem moduladas em resposta ao estresse e à progressão de transtornos afetivos (Scola e Andreazza, 2015). Einat e Manji (2006), chamam a atenção para a atividade da enzima glicogênio-sintase quinase-3 (GSK3) no curso do TAB. Essa enzima foi descrita como sendo um dos principais alvos do mecanismo de ação da droga lítio (uma das drogas utilizada no tratamento de TAB) (Beaulieu et al., 2004) e possui participação nas cascatas de sinalização do sistema mono-aminérgico e dos fatores de crescimento, cascatas estas que estão associadas à inúmeros processos regulatórios cerebral. Por tanto, a GSK3 é vista por muitos pesquisadores como importante na patofisiologia dos transtornos afetivos (Sigitova et al., 2017; Einat e Manji, 2006; Beaulieu et al., 2004).

1.6.1.1. Fator neurotrófico derivado do cérebro

O BDNF é uma neurotrofina que ganhou destaque como um biomarcador de interesse psiquiátrico por conta de estudos *post mortem* de cérebros de indivíduos com TAB, que indicaram diminuição nos níveis de proteína e ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de BDNF na região do córtex frontal. Este achado pode indicar que a diminuição dos níveis de BDNF possam estar correlacionados com parte da patofisiologia do TAB (Fernandes et al., 2014; Kim, Rapoport e Rao, 2010). Estudos sugerem o potencial do BDNF como um biomarcador de episódios de humor no TAB, demonstrando que pacientes sofrendo de episódios de mania, hipomania ou depressão poderiam ter o nível baixo de concentração de BDNF no sangue periférico, quando comparados aos sujeitos eutímicos (Cunha et al., 2006; Fernandes et al., 2011). É importante lembrar que concentrações de BDNF no sangue periférico refletem concentrações desta proteína no tecido cerebral. O BDNF é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica por um sistema de transporte (Sigitova et al., 2017; Fujimura et al., 2002). Em um dos estudos pioneiros nesta área, Cunha et al. (2006) demonstraram que em pacientes com TAB existe um decréscimo significativo de BDNF durante as fases de mania e depressão em relação ao grupo controle. Isto sugere que o BDNF é mais relacionado a um estado-dependente e não a um traço. (D'Addario et al., 2012; Wang et al., 2012).

Dados clínicos de uma meta-análise sugere que os níveis de BDNF periférico estão significativamente baixos nos estados de mania, hipomania e depressão, mas normais durante estado eutímico do TAB (Polyakova et al., 2015). Foi visto também que os níveis aumentados de BDNF periférico, após tratamento medicamentoso, está correlacionado a uma melhora clínica de um estado de mania e depressão. Esses dados sugerem o BDNF periférico como

um potencial biomarcador para episódios de mania e depressão (Piccinni et al., 2015).

1.6.1.2. Fator neurotrófico derivado da glia

O GDNF é uma neurotrofina importante na regulação da neuroplasticidade, sinalização do neurotransmissor ácido aminobutírico (GABA) e monoaminas e ativador de micróglia (Maletic e Raison, 2014). Nos últimos anos, alguns poucos estudos avaliaram níveis plasmáticos de GDNF em pacientes com TAB, sugerindo haver uma correlação negativa entre intensidade de sintomas afetivos e níveis de GDNF (Barbosa et al., 2011; Zhang et al., 2010). No entanto, achados de GDNF no sangue periférico em TAB são menos consistentes do que os achados de BDNF (Maletic e Raison, 2014). Em estudos avaliando GDNF em pacientes com TAB em fase de mania, depressão e eutímia, os resultados são conflitantes com relatos tanto de elevação (Barbosa et al., 2011; Rosa et al., 2006) como de diminuição (Takebayashi et al., 2006; Zhang et al., 2010) desta neurotrofina no sangue periférico. Em estudos mais recentes, há relatos de associação entre depressão unipolar e níveis de GDNF diminuídos no sangue periférico, enquanto nos casos de depressão bipolar o GDNF pode não apresentar alterações significantes (Maletic e Raison, 2014).

Apesar da GDNF ser produzida por toda a extensão cerebral, esta neurotrofina se demonstra incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica e acredita-se que sua produção no sangue periférico é proveniente de uma variedade de tecidos periféricos. Embora muitos estudos pesquisem a correlação dos níveis periféricos de GDNF com o nível desta proteína no sistema

nervoso central, resultados ainda se mostram pouco claros acerca desta questão (Scola e Andreazza, 2015).

1.6.2. Glicogênio-sintase quinase – 3 – β

Acreditava-se que esta enzima estaria apenas envolvida no metabolismo energético, por meio da homeostasia da atividade da enzima glicogênio sintase – enzima importante no metabolismo do glicogênio intracelular (Embi, Rylatt e Cohen, 1980). Outros estudos demonstraram que a GSK3- β também estaria atrelada a outras vias de sinalização intracelular, além do glicogênio sintase, participando de funções celulares e regulação do metabolismo energético (Jia et al., 2018; Alabed et al., 2010).

Nos neurônios, as principais vias de sinalização regulatórias da GSK3- β são a via canônica da Wnt-1 (*Wingless-type MMTV integration site family, member 1*)/ β -catenina e PI-3k/Akt (Jia et al., 2018; Alabed et al., 2010; Inesterosa e Arenas, 2009). Logo, a atividade da GSK3- β influencia diversas vias de sinalização intracelular que controla aspectos essenciais do funcionamento neural como neuroplasticidade, neurotransmissão, crescimento neural e morte neural (Jia et al., 2018), bem como regulando a diferenciação de oligodendrócitos e mielinização (Bartzokis, 2012). Entretanto, foi visto que a atividade da GSK3- β poderia estar inversamente relacionada à viabilidade neuronal, comprometendo a homeostasia neural, levando a degeneração e morte neuronal (Matsuda et al., 2019; Ryves e Hardwood, 2003). Estudos mostraram que a forma ativa da GSK3- β retarda a reparação de axônios desmielinizados, enquanto sua inibição (ou

fosforilação) promove reparo ao neurônio e mielinização, fazendo assim com que a enzima GSK3- β seja associada à parte da patofisiologia do TAB (Scola e Andreazza, 2015; Alabed et al., 2010; Bartzokis, 2012). Um estudo avaliando pacientes com depressão bipolar, utilizando DTI, mostrou que pacientes contendo variantes do gene que codifica a GSK3- β estariam associados a menor atividade enzimática e uso mais prolongado de lítio associaram-se a maiores medidas de mielinização em diversos tratos de SB cerebral (Benedetti et al, 2013). Poucos estudos até o momento avaliaram a atividade da GSK3- β no sangue periférico de pacientes com TAB, geralmente relatando redução da fração fosforilada (inativa) da enzima em pacientes comparado a controles saudáveis (CS) (Jope, 2011).

Tendo em vista a relevância desta enzima na participação de diversas vias de sinalização, cresce o interesse em estudos sobre a alteração da atividade desta enzima em tratamento de doenças cerebrais degenerativas (ex. doença de Alzheimer) e nos transtornos psiquiátricos, como o TAB (Alabed et al., 2010).

Os estudos mencionados no item 1.6 demonstram o importante potencial das neurotrofinas (BDNF e GDNF) e da enzima GSK3 β em transtornos psiquiátricos como o TAB. No entanto, não há relatos de estudos que integrem informações sobre estes biomarcadores com dados de DTI em TAB sem tratamento prévio, utilizando um método automatizado de tractografia (TRACULA).

2. OBJETIVO

O presente projeto utilizou dados de RM, para avaliar alterações nos tratos de SB que conectam as regiões do CPF e regiões do sistema límbico em sujeitos com TAB sem tratamento prévio e CS. Para esta investigação foi utilizado o método automatizado TRACULA para a reconstrução dos tratos (ex. UNC, CCG e ATR). Ainda, pesquisamos por possível correlação entre alterações na integridade de SB e biomarcadores encontrados no sangue periférico (BDNF, GDNF e GSK3- β) em sujeitos com TAB sem tratamento prévio.

Desta forma os objetivos do presente estudo compreendem:

1. Comparar a integridade dos tratos de SB UNC, CCG e ATR entre sujeitos com TAB sem tratamento prévio e CS.
2. Comparar concentrações dos biomarcadores neurotróficos (BDNF e GDNF) e enzima GSK3- β (na sua forma ativa, fosforilada e quantidade total) entre sujeitos TAB sem tratamento prévio e CS.
3. Correlacionar índice de FA de SB alterado com os biomarcadores BDNF, GDNF e GSK3- β entre os sujeitos com TAB sem tratamento prévio.

3. HIPOTESES

Nossas principais hipóteses são:

1. O grupo de sujeitos com TAB sem tratamento prévio terá baixa integridade nos tratos de SB UNC, CCG e ATR, comparado ao CS.
2. Haverá diminuição na concentração das neurotrofinas BDNF e GDNF, no sangue periférico, em comparação ao CS.
3. Haverá aumento na expressão plaquetária da enzima GSK3- β (forma ativa) em sujeitos TAB sem tratamento prévio em comparação ao CS.
4. Haverá diminuição na expressão plaquetária da enzima GSK3- β (forma fosforilada) em sujeitos TAB sem tratamento prévio em comparação ao CS.
5. Haverá correlação direta entre anormalidades nos tratos de SB e reduções nas dosagens de neurotrofinas em sujeitos TAB sem tratamento prévio.
6. Haverá correlação direta entre anormalidades nos tratos de SB e aumento de GSK3- β (forma ativa) em sujeitos TAB sem tratamento prévio.

4. MÉTODOS

4.1. Amostra

O presente projeto foi desenvolvido com uma amostra de indivíduos com TAB e CS, coletados durante a realização dos projetos “Discriminação Diagnóstica e Avaliação Longitudinal de Alterações Cerebrais, Imunológicas e Moleculares Estado-Dependentes em Indivíduos com Primeiro Episódio Psicótico” (Edital Universal MCT/CNPq No. 14/2009, No. do Processo: 480370/2009-5) e “Acurácia diagnóstica e predição de resposta a tratamento em sujeitos adultos com TDAH e transtorno bipolar: classificação individual de imagens de Ressonância Nuclear Magnética de crânio combinadas com genotipagem” (financiado através do NARSAD Independent Investigator Award 2010, *Brain & Behavior Research Foundation*), ambos de responsabilidade do Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho.

4.1.1. Triagem

Os participantes com TAB foram encaminhados ao Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (IPq/HCFMUSP), após divulgação do estudo em rádio, jornal, internet e em nossa instituição do Hospital das Clínicas (HC). Foi realizado também contato ativo com serviços de saúde da região metropolitana da cidade de São Paulo para divulgação de nosso estudo. Voluntários saudáveis foram recrutados através de divulgação em nossa

instituição, comunidade próxima ou via internet. O material utilizado para divulgação continha as características dos voluntários procurados assim como a natureza geral do estudo.

Pacientes e CS referenciados para nosso estudo foram inicialmente avaliados por psiquiatras treinados para o levantamento de critérios de inclusão e exclusão, empregando-se para isto entrevista clínica geral (incluindo tempo de início de doença, histórico de trauma crânio-encefálico, histórico de desenvolvimento neuropsicomotor e desempenho escolar, e dados sobre o uso de medicações psicotrópicas) e estruturada, esta através do instrumento *Structured Clinical Interview for DSM-IV* (SCID) (First et al, 1995). Os pacientes foram avaliados pela Escala de Mania de Young (Young et al., 1978) e Escala de depressão de Hamilton (Hamilton, 1960). Tanto os pacientes quanto os CS tiveram a lateralidade avaliada utilizando o Teste de Lateralidade Manual – Inventário de Edimburgo (Oldfield, 1971). Além disto, tanto pacientes como controles preencheram os questionários de auto-aplicação *Alcohol Use Disorders Identification Test* (Saunders et al, 1993) e *SouthWestminster Questionnaire* (Menezes et al, 1996) visando rastreamento para uso de substâncias; o diagnóstico de transtorno de uso de substâncias foi feito utilizando-se o SCID.

4.1.2. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão de pacientes para o estudo foram:

- a) Idade entre 16 e 50 anos na época da avaliação;

- b) Diagnóstico de TAB-I ou TAB-II, sem comorbidade, de acordo com os critérios de diagnóstico do DSM-IV;
- c) Pacientes preenchendo critérios diagnósticos de acordo com DSM-IV para o TAB;

Controles saudáveis, sem história psiquiátrica pessoal, obtida pela entrevista diagnóstica do SCID, e sem parentes de primeiro grau com história de transtornos do Eixo I, exceto fobias específicas, também foram recrutados

4.1.3. Critérios de exclusão

Critérios de exclusão utilizados tanto para pacientes quanto para controles, foram:

- a) Tratamentos prévios com medicações psicotrópicas;
- b) Diagnóstico atual ou passado, ao longo de toda a vida, de abuso ou dependência de substâncias, exceto nicotina, pelo SCID;
- c) História de trauma crânio-encefálico com perda de consciência;
- d) Transtorno neurológico ou qualquer condição que pudesse afetar o sistema nervoso central;
- e) Retardo mental leve, moderado ou grave;
- f) Contraindicações para exame de RM, como presença de objetos metálicos no corpo, marca-passo, claustrofobia, entre outros;
- g) Gestação.

Usou-se como critério adicional de exclusão a presença de história atual ou pregressa de qualquer outro transtorno psiquiátrico maior.

A seleção do CS foi feita de modo que fosse possível um pareamento individual para gênero e idade, dentro de uma faixa de 3 anos.

4.2. Desenho do Estudo

Este foi um estudo controlado de base populacional, transversal, que pretendeu caracterizar alterações na integridade de tratos de SB investigadas por meio da RM e correlacionando seus resultados com concentrações dos biomarcadores BDNF, GDNF e GSK3- β , em uma amostra sujeitos contendo grupo de pacientes com TAB e grupo CS, da comunidade.

4.3. Aquisição das imagens de Ressonância Magnética

Todas as imagens foram coletadas utilizando o aparelho de RM Espree Siemens 1,5T (Siemens, Erlangen, Alemanha) localizado no Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP.

A sequência de DTI foi adquirida com uma bobina de 12 canais, além de ser ajustada ao ritmo cardíaco. As imagens de difusão foram baseadas em uma aquisição de imagem eco-planar (*echo-planar image* – EPI) e consistiu em uma imagem sem gradiente de difusão ($b=0\text{s/mm}^2$) e imagens de difusão coletadas em 64 direções não-colineares ($b=1,000\text{s/mm}^2$). Os seguintes parâmetros foram utilizados: TR = 8.000 ms, TE = 110 ms, NEX = 2, FOV = 240 x 240 mm, espessura do corte = 2,7 mm (sem espaço entre os cortes), 50 cortes, matriz = 120 x 120 pixels, tamanho do voxel = 2,0 x 2,0 x 2,7mm.

O protocolo de coleta também incluiu uma sequência sagital ponderada em T1 (*Magnetization-Prepared Rapid Gradient Echo Sequence* – MPRAGE). Os seguintes parâmetros foram utilizados: TR = 2,400 ms, TE = 3.65 ms, NEX = 1, FOV = 240 mm, flip angle = 80, matriz = 192 x 192 pixels, espessura de corte = 1.2 mm (sem espaço entre os cortes), tamanho de voxel = 1.3 x 1.3 x 1.2 mm, resultando em 160 cortes abrangendo todo o encéfalo, uma sequência transaxial ponderada em T2 (*turbo spin-echo*) (24 cortes, espessura do corte = 5mm, 1mm entre os cortes), e uma sequência axial inversão-recuperação com atenuação de líquido (*fluid attenuated inversion recovery* – FLAIR) (24 cortes, do corte = 5mm, 1mm de espaçamento). Em média, o protocolo completo foi coletado em 25 minutos.

As imagens de todos os sujeitos foram inspecionadas visualmente por neurorradiologista experiente, à procura de lesões grosseiras, silenciosas e artefatos que poderiam interferir na análise da imagem e no pós processamento.

4.4. Processamento das imagens cerebrais de Ressonância Magnética:

A análise e o processamento de imagens estruturais e de DTI foram realizados no Laboratório de Neuroimagem em Psiquiatria (LIM-21) do HCFMUSP.

4.4.1. Processamento das imagens T1

As imagens estruturais, coletadas em formato DICOM, foram convertidas para NIfTI utilizando o software “dcm2nii” disponível no pacote MRICron (www.mccauslandcenter.sc.edu/mricro/mricron). A seguir, foi realizado nova inspeção visual de controle de qualidade, sendo excluídas imagens com artefatos que potencialmente influenciariam o processamento e análise dos dados.

As imagens T1 foram pré-processadas para remoção acurada do tecido não cerebral (*skull-stripping*) e correção de não homogeneidade de sinal. O *skull-stripping* foi realizado utilizando o método automatizado, baseado na técnica do MAS, conhecido como *Multi-Atlas Skull-Stripping* (MASS version 1.1) (Doshi et al., 2013). Cada imagem resultante foi inspecionada à procura de imperfeições do processo (ex. erosões corticais ou restos de tecido extra cerebral) e correções foram feitas manualmente usando o programa MRIcon (<http://www.mricro.com>). Em seguida, as imagens foram segmentadas segundo a *pipeline* “autorecon” disponível no FreeSurfer (<http://surfer.mmr.mgh.harvard.edu>).

4.4.2. Reconstrução automatizada cortical e subcortical das imagens T1

A reconstrução automatizada cortical e subcortical das imagens ponderadas em T1 incluem o protocolo padrão de reconstrução automatizada (*automatic reconstruction* – autorecon) do FreeSurfer (Quadro 1). Tendo em vista que as imagens já haviam sido processadas para remoção de tecido extra

cerebral e corrigidas para não homogeneidade de sinal, estes passos não foram realizados, na descrição do quadro abaixo:

Etapa	Descrição
autorecon1	Correção de movimentação de cabeça Normalização intensidade não uniforme Transformação computacional em tailarach Normalização de intensidade 1 Skull strip
autorecon2	Registro volumétrico linear Normalização de intensidade Registro volumétrico não linear Segmentação de pescoço 1 Segmentação de pescoço 2 - registro Parcelamento volumétrico e estatística Ponto de controle 1 - Normalização de intensidade 2 Segmentação de substância branca Ponto de controle 2- edição de substância branca Preenchimento (início da edição de substância branca) Tecelamento cortical Suavização 1 Inflamento cortical 1 Ajuste topológico automatizado (Qsphere) 1 Ajuste topológico automatizado (Qsphere) 2 Estágio final das superfícies (pial, branca, espessura e curvatura) Ponto de controle 3 - superfícies Suavização 2 Inflamento cortical 2
autorecon3	Mapeamento esférico Registro esférico Registro esférico, hemisfério contralateral mapear curvatura média do sujeito Parcelamento cortical - Desikan_Killiany e Christophe (marcação) Estatística do parcelamento cortical Mascara cortical (limite cortical) Mapeamento do parcelamento cortical para Aseg"

Quadro 1 – Protocolo padrão de reconstrução automatizada (autorecon). Composto por três etapas autorecon 1, 2 e 3. Para cada etapa do processamento diversas ações são realizadas, ações estas listadas na coluna ao lado direito.

4.4.3. Processamento de imagens DWI – TRACULA

As imagens DWI foram submetidas ao processamento utilizando o método do TRACULA para a reconstrução automática dos tratos de SB de todos os sujeitos (TAB e CS), utilizando como premissa a anatomia segmentada obtida pelo processamento das imagens ponderadas em T1 (descrito no subitem 4.4.2), conforme descrito anteriormente (Yendiki, 2011). O processamento TRACULA envolve os seguintes passos:

- **Pré-processamento** - abrange sete passos, sendo eles:
 - a) Correções de imagem - Conversão dos arquivos DICOM de DWI para NIfTI.
Corrige as heterogeneidades do campo magnético (B_0) e a delimitação de bordas e movimentos simples de crânio. Por último, esse passo cria uma máscara craniana, com base nas difusões de baixo valor de b (b-zero);
 - b) Avaliação de Qualidade da Imagem – Computa quatro medidas de movimentação de cabeça, baseado nas imagens DTI e nos arquivos de delimitação de bordas gerados da etapa de Correções de imagem;
 - c) Registro Intra Sujeito – Realiza um registro individual entre as imagens de difusão de baixo valor de b (b-zero) e as de T1 de cada sujeito;
 - d) Registro Inter Sujeito – Registra a imagem T1 do sujeito com a de um modelo, MNI ou CVS;
 - e) Criação de Máscaras – Esse passo permite criar máscara para SB, extraíndo-a das regiões cerebral, cerebelar, diencefalo ventral e tronco encefálico utilizando o parcelamento cortical do FreeSurfer

(<http://freesurfer.net/fswiki/CorticalParcellation>) e a segmentação subcortical (<http://freesurfer.net/fswiki/SubcorticalSegmentation>). Este passo transforma todas as máscaras já criadas de espaço individual T1 para espaço individual de difusão e em espaço molde (*template*). Isso é realizado usando os registros que foram computados nos passos de “Registro intra sujeito” e “Registro inter sujeito”;

f) Ajuste do Tensor – Esse passo realiza a estimativa de tensor. Mapeia-se todas as escalas volumétricas geradas a partir dos tensores e do espaço de difusão para o espaço de molde (*template*). Isto é realizado usando os registros que foram computados nos passos “Registro intra sujeito” e “Registro inter sujeito”;

g) Estimação das Vias – Computar as vias no espaço de molde (*template*) combinando as informações do atlas (sujeitos testes com vias e segmentações anatômica manualmente marcadas) com as máscaras de cada indivíduo, que foram geradas no passo de “Criação de Máscaras”. As informações providas dos sujeitos testes são usadas para estimar probabilidades *a priori* de que cada trato passa próximo ou cruza com cada indicação do parcelamento cortical e segmentação subcortical a cada ponto ao longo da trajetória do trato. Os sujeitos testes também são utilizados para obter as regiões de início e fim de cada trato, que posteriormente serão usados para reconstruir a tractografia no passo “Reconstrução dos Tratos.

- **Modelo *ball-and-stick*** – O algoritmo bedpostX, disponível no *FMRIB Software Library* (FSL) (http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fdt/fdt_bedpostx.html), é

responsável por reconstruir as vias de trato de SB provenientes dos dados da DWI.

- **Reconstrução dos Tratos** – Esse passo estima a distribuição de uma probabilidade sobre a localização de cada trato no sujeito. Essa distribuição consiste na probabilidade, voxel-a-voxel, da orientação dos tratos e em um termo *a priori* (computado no passo ‘Estimação das Vias’). Esse passo também utiliza a estimativa de distribuição dos tratos para extrair dados quantitativos de medidas de difusividade (ex. FA) para cada trato, disponibilizando-os para a análise estatística.

Para acessar informações sobre a microestrutura de SB dos tratos que conectam a região PFC e regiões do sistema límbico nós selecionamos três tratos: UNC, CCG e ATR (Figura 4).

4.5. Controle de Qualidade

O controle de qualidade foi realizado após o término do processamento das imagens T1 e após o processamento do TRACULA. Os procedimentos utilizados para este controle de qualidade foram baseados no protocolo do (ENIGMA: *The Enhancing Neuro Imaging Genetics Through Meta-Analysis*) (<http://enigma.usc.edu/>), que inclui a avaliação de histogramas e análise de *outliers*, inspeções visuais das imagens segmentadas de T1 e dos mapas de FA contendo a sobreposição dos autovetores principais (v_1) voxel a voxel – sendo então possível a visualização do v_1 alinhado com a direção da fibra predominante

da região. Adicionalmente ao protocolo de controle de qualidade do ENIGMA nós inspecionamos visualmente os tratos de SB reconstruídos ao longo do mapa de FA. Plotamos um histograma utilizando as médias de FA dos tratos ATR, CCG e UNC para detectar possíveis *outliers*. Por fim, inspeções visuais incluindo avaliação de sub/superestimação de segmentação cortical e contornos anatômicos foram realizados utilizando figuras, disponibilizadas pelo ENIGMA, contendo bons e maus exemplos de segmentação de imagens T1. A figura 5 exemplifica a inspeção visual conduzida para checar a reconstrução anatômica do trato de SB e o alinhamento do v_1 ao longo do mapa de FA. Nos casos em que o trato falhava na inspeção visual do controle de qualidade, o mesmo era excluído, bilateralmente, de futuras análises. A tabela 1 representa a quantidade de tratos excluídos dos grupos TAB e CS.

Figura 5 – Controle de Qualidade. (A) mapa de direção vetorial, (B) região ampliada do corpo caloso, e (C) mapa de FA com trato de substância branca reconstruído. (A) demonstra a direção preferencial do vetor principal (v_1) ao longo das fibras de substância branca. (B) durante o controle de qualidade é realizado inspeção visual da direção vetorial do v_1 , averiguando se o v_1 segue perpendicularmente às fibras de substância branca. (C) demonstra um trato de substância branca (radiação talâmica anterior) que passou, satisfatoriamente, no controle de qualidade.

Tabela 1: Controle de Qualidade – tratos excluídos

	TAB	CS
Fascículo uncinado (UNC)	1	1
Radiação talâmica anterior (ATR)	1	1
Cíngulo (CCG)	3	6

4.6. Dosagem dos biomarcadores no Sangue Periférico

A dosagem das neurotrofinas BDNF e GDNF no sangue periférico foi realizada no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob orientação do Prof. Dr. Antônio Lucio Teixeira Junior. Já o isolamento das plaquetas do sangue total e a determinação de expressão e atividade da enzima GSK3- β em plaquetas foram realizados no Laboratório de Neurociências (LIM-27) do HCFMUSP.

4.6.1. Coleta do sangue periférico e preparo de plaquetas

No dia da avaliação psiquiátrica, amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, para cada participante do estudo (casos e controle), no período matutino (de 8 a 10 horas). Todos os sujeitos estavam em jejum de 8 a 10 horas. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 515xG por 15 minutos a 20°C em uma solução de dextrose e citrato ácido. O plasma foi separado e estocado a -70°C. Para o preparo das plaquetas, alíquotas de plasma rico em plaquetas (PRP) foram resuspensas em solução de lavagem (citrato de sódio 30 nM pH 6.5, cloreto de potássio 5 nM, cloreto de cálcio 2 nM, cloreto de magnésio 1 nM, glicose 5 nM, albumina 500 μ g/mL e apirase 50 μ g/mL), centrifugadas a 1159xG por 8 minutos a 20°C. O sobrenadante foi resuspenso em solução de tris-sucrose e as alíquotas de plaquetas foram armazenadas imediatamente em freezer a -70°C até as análises.

4.6.2. Análise dos fatores neurotróficos (BDNF e GDNF)

As concentrações de BDNF e GDNF dos pacientes com TAB e CS foram mensuradas pela técnica ELISA sanduíche, seguindo-se as orientações do fabricante (*DuoSet, R&D Systems*, Minneapolis, MN, EUA). A cada poço da placa de ELISA foram adicionados 100 µL de solução contendo anticorpo monoclonal contra o fator neurotrófico que se pretendia mensurar (BDNF ou GDNF) diluído em tampão fostato (PBS). As placas foram incubadas por pelo menos 12 horas à 4°C. Os anticorpos não aderidos nas placas foram descartados por inversão e lavagem em PBS-Tween. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de uma solução contendo PBS-albumina bovina 1% durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois de uma lavagem das placas, em cada poço, foi adicionado 100 µL da amostra ou o padrão. Para a dosagem de BDNF, as amostras foram diluídas em uma proporção 1:3 em PBS-albumina bovina 0.1%. Já para a dosagem do GDNF, as amostras não foram diluídas.

Após lavagem, anticorpos conjugados com biotina e diluídos em PBS-albumina bovina 0.1% foram adicionados, sendo as placas incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Logo após a lavagem, estreptoavidina conjugada com peroxidase foi acrescentada nas placas, que foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, após nova lavagem, o cromógeno 0-fenileno-diamina foi aplicado às placas que foram incubadas na ausência de luz. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda

de 492 nM (*Emax*, Aparelhos Moleculares, Mineapolis, MN, EUA). O coeficiente inter e intra ensaio foi < 5% e as concentrações estão expressas em pg/mL.

4.6.3. Expressão de GSK3- β em plaquetas e determinação indireta da atividade enzimática

Antes das análises bioquímicas, a concentração proteica de cada amostra de plaqueta foi determinada através do método de Lowry modificado, sendo normalizada para 0,1 mg/mL com tampão apropriado e solução de inibidores de protease fornecido pelo fabricante do ensaio. As plaquetas foram rompidas com o tampão celular RIPA modificado pela adição do inibidor de protease PIC (Sigma P8340) e PMSF (Sigma P7626). Os níveis plaquetários da GSK3- β total (T-GSK3- β) e da Ser-9 fosfo-GSK3- β (P-GSK3- β) foram determinados por um Ensaio Imunométrico Enzimático (EIA - Enzyme Immunometric Assay) (TiterZyme EIA - Assay Designs, Inc). TiterZyme EIA é um ensaio que utiliza anticorpos monoclonais imobilizados na parede da placa de ensaio que se ligam a GSK3- β humana presente nas amostras experimentais. Os pontos da curva de padronização do ensaio foram geradas a partir de diluições seriadas das amostras (P- GSK3- β : 2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5; 0 pg/mL; T-GSK3- β : 5000; 2500; 1250; 625; 312.5; 156.3; 78.1; 0 pg/mL).

Cem microlitros de solução padrão ou amostra foram pipetados em cada poço da placa de ensaio. A placa de ensaio foi vedada e incubada em temperatura ambiente, sob agitação, por 1 hora. Após a incubação, cada poço foi esvaziado e a placa de ensaio foi lavada com 400 μ L de solução

de lavagem. Este procedimento foi repetido por 5 vezes. Após a última lavagem, 100 µL de anticorpos policlonais anti-T-GSK3-β e anti-P-GSK3-β foi adicionado a cada poço da placa de ensaio, exceto nos poços vazios (*"blanks"*). A placa de ensaio foi vedada e incubada em temperatura ambiente, sob agitação, por mais 1 hora. Novamente, as placas foram esvaziadas e lavadas por 5 vezes. Cem microlitros de anticorpos monoclonais anti-T-GSK3-β e anti-P-GSK3-β conjugados com horseradish peroxidase, que se ligam aos anticorpos policlonais anti-T-GSK3-β e anti-P-GSK3-β, foram adicionados a cada poço da placa de ensaio. A placa de ensaio foi vedada e incubada em temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. A placa de ensaio foi esvaziada e lavada por 5 vezes. Cem 44 µL de solução substrato foi adicionado a cada poço da placa de ensaio e a reação enzimática foi interrompida após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. A cor gerada pela reação enzimática foi lida na frequência de 450 nm.

A atividade da GSK3-β, para cada amostra, foi inferida indiretamente através da razão da GSK3-β, como descrito anteriormente (Forlenza et al., 2011) (equação 1).

$$\text{Razão da GSK3-}\beta = \frac{\text{P-GSK3-}\beta}{\text{T-GSK3-}\beta} \quad (1)$$

A razão da GSK3-β nos informa sobre a proporção entre a concentração da forma inativa da proteína (ex. P-GSK3-β) e a sua concentração total em uma

amostra. Portanto, quanto menor a razão da GSK3- β , maior a atividade enzimática, e vice-versa.

4.7. Análise Estatística

Para as comparações de dados demográficos, BDNF, GDNF e GSK3- β (suas frações e razão) foram empregados o teste t de Student e os testes de Qui-Quadrado ou teste exato de Fischer para variáveis categoriais, utilizando o pacote estatístico SPSS (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL), em sua versão 22.0. A significância estatística para todas as análises realizadas foram estabelecidas para valores de $p < 0,05$.

Para os dados de neuroimagem, utilizamos os valores da média de FA de cada trato para comparar as médias entre os grupos (TAB vs CS). Foi utilizado o `mri_glmfit` do FreeSurfer, que utiliza o R 3.0.2 (<http://cran.r-project.org>) para iniciar o Modelo Linear Generalizado (*General Linear Model* – GLM). A significância estatística para esta análise realizada foi estabelecida para valores de $p < 0,05$.

Por último, foi utilizado o pacote estatístico SPSS para calcular o coeficiente de correlação de *Pearson* entre a média dos valores de FA e a média de valores dos biomarcadores (BDNF, GDNF e GSK3- β (suas frações e razão). A significância estatística para esta análise de correlação foi estabelecida para valores de $p < 0,05$.

4.8. Aspectos Éticos

Os estudos que geraram o banco de dados para o presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Todos os participantes assinaram termo de consentimento após terem sido adequadamente informados sobre o estudo.

5. RESULTADOS

5.1. Descrição da Amostra: Dados Demográficos e Clínicos

Trinta indivíduos com TAB sem e 42 CS compõem a amostra final para as análises de neuroimagem.

Com relação às coletas de sangue, obtivemos a amostra de 26 sujeitos do grupo TAB e 38 CS para as análises de BDNF, GDNF e GSK3- β . Problemas técnicos impossibilitaram a avaliação de quatro sujeitos do grupo TAB e quatro do CS.

Os dados clínicos e demográficos dos sujeitos participantes estão descritos na Tabela 2. Não houve diferenças estatísticas significantes entre o grupo TAB e os CS para as variáveis demográficas de idade, gênero, lateralidade e anos de educação.

Tabela 2: Informações demográficas e clínicas para pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) e controles saudáveis (CS).

	TAB (N=30)	CS (N=42)	Teste Estatístico (TAB vs CS)
Idade ($\pm$ DP)	28,87 ($\pm$ 6.22)	27,19 ($\pm$ 5.64)	$t=-1,190$, $df=70$, $p=0,528$
Gênero - masculino (%)	12 (40.0%)	26 (61.9%)	$\chi^2=3,369$, $df=1$, $p=0,066$
Lateralidade - destro (%)	29 (96.7%)	40 (95.2%)	Teste exato de Fischer, $p=1$
Anos de educação ($\pm$ DP)	12.70 ($\pm$ 2.39)	12,86 ($\pm$ 3.79)	$t=1,894$, $df=70$, $p=0,173$
Duração de psicose não tratada ($\pm$ DP; min; máx.)	60 $\pm$ 78 (1;360)		
Psicose (%)	7 (23.3%)		
HDRS ($\pm$ DP)	15 ($\pm$ 7)		
YMRS ($\pm$ DP)	11 ($\pm$ 11)		
TAB tipo I/II	15/15		
Episódio de Humor (%)			
- Depressão	14(46.7%)		
- Mania/Episódios mistos	10 (33.3%)		
- Hipomania	2 (6.7%)		
- Eutímia	4 (13.3%)		

Legenda: DP: desvio padrão; HDRS: Escala de depressão de Hamilton; YMRS:

Escala de mania de Young; TAB: Transtorno afetivo bipolar.

5.2. Comparação dos tratos de SB entre grupos

A tabela 3 apresenta as médias de FA dos tratos de SB UNC, CCG e ATR dos grupos TAB e CS e o resultado da comparação entre os grupos. Dois tratos do hemisfério esquerdo, correspondendo aos tratos UNC e ATR, mostraram resultado estatisticamente significativo, com diminuição na média de FA no grupo TAB.

Tabela 3: Valores médios de FA e diferenças entre pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) e controles saudáveis (CS).

	Valor médio de FA (média±DP)		Teste estatístico (TAB vs CS)		
	TAB	CS	F	df	p
UNC-D	0,3658±0,028	0,3714±0,027	0,91	68	0,34
UNC-E	0,3655±0,039	0,3824±0,030	4,42	68	0,03
CCG-D	0,4388±0,49	0,4421±0,050	0,49	61	0,48
CCG-E	0,4807±0,063	0,4834±0,047	0,32	61	0,57
ATR-D	0,3957±0,025	0,4054±0,029	3,34	66	0,07
ATR-E	0,3954±0,029	0,4165±0,030	8,54	66	0,004

Legenda: UNC: fascículo uncinado; CCG: cíngulo; ATR: radiação talâmica anterior; D: direito; E: esquerdo; TAB: transtorno afetivo bipolar; CS: controle saudável; DP: desvio padrão.

5.3. Comparação entre Grupos de Biomarcadores no Sangue Periférico

A tabela 4 apresenta as médias de concentração de neurotrofinas (BDNF e GDNF) no plasma, além da expressão plaquetária da GSK3- β total, sua fração fosforilada e a razão GSK3- β . As neurotrofinas BDNF e GDNF não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Apenas a enzima GSK3- β total, sua fração fosforilada e a razão de GSK3- β apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 4: Valores médios de concentração de neurotrofinas (BDNF e GDNF), expressão plaquetária da GSK3- β e diferenças entre pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) e controles saudáveis (CS).

	Valor médio (média $\pm$ DP; pg/mL)		Teste estatístico (TAB vs CS)		
	TAB	CS	t	df	p
BDNF	8840 $\pm$ 6530	6961 $\pm$ 4440	- 1,39	64	0,168
GDNF	186 $\pm$ 250	240 $\pm$ 314	0,74	64	0,457
GSK3- β total	2979 $\pm$ 1307	2294 $\pm$ 701	- 2,75	64	0,008
GSK3- β fosforilada	710 $\pm$ 549	1135 $\pm$ 624	2,84	64	0,006
Razão GSK3- β	0,292 $\pm$ 0,292	0,561 $\pm$ 0,512	2,45	64	0,017

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; GDNF: fator neurotrófico derivado da glia; GSK3- β : glicogênio sintase quinase 3- β ; TAB: transtorno afetivo bipolar; CS: controle saudável; DP: desvio padrão.

5.4. Correlação entre alteração de Substância Branca e Biomarcadores do Sangue Periférico

Tendo em vista que a diferença da média de FA entre os grupos foi restrita ao UNC esquerdo e ATR esquerdo, as análises de correlação com a concentração de biomarcadores do sangue periférico (BDNF, GDNF e GSK3- β) foram restritas entre esses dois tratos de SB, a fim de reduzir o número de testagens estatísticas e o risco de resultados falso-positivos. Estas análises foram conduzidas separadamente no grupo de sujeitos TAB (Tabela 5) e no grupo controle (Tabela 6).

Como mostra a Tabela 5, no grupo de pacientes com TAB, a neurotrofina BDNF apresentou correlação positiva significativa com ambos os tratos de SB no hemisfério esquerdo (UNC e ATR). A neurotrofina GDNF não teve correlação significativa com os tratos UNC ou ATR. Também não foram detectadas correlações significantes entre os índices relacionados à enzima GSK3- β (T-GSK3- β , P-GSK3- β e razão - GSK3- β) e os tratos com alteração de SB no grupo TAB (UNC e ATR).

Já a Tabela 6 mostra que, no grupo de controles saudáveis, a enzima P-GSK3- β apresentou correlação positiva significativa com o trato UNC, no hemisfério esquerdo. A neurotrofina GDNF não teve correlação significativa com os tratos UNC ou ATR. Também não foram detectadas correlações significantes entre os índices da enzima GSK3- β (T-GSK3- β e razão - GSK3- β) e os tratos de SB (UNC e ATR)., no grupo CS.

Tabela 5: Análise de correlação de Pearson entre valores médios de FA dos tratos UNC e ATR e biomarcadores do sangue periférico - em pacientes com TAB.

	Fascículo Uncinado			Radiação Talâmica Anterior		
	N	r	p	N	r	p
BDNF	26	0,73	0,01	26	0,46	0,05
GDNF	26	- 0,19	0,33	26	- 0,22	0,26
GSK3- β total	26	0,03	0,88	26	0,31	0,12
GSK3- β fosforilada	26	0,03	0,85	26	- 0,05	0,80
Razão GSK3- β	26	- 0,19	0,33	26	0,12	0,53

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; GDNF: fator neurotrófico derivado da glia; GSK3- β : glicogênio sintase quinase 3- β ; TAB: transtorno afetivo bipolar.

Tabela 6: Análise de correlação de Pearson entre valores médios de FA dos tratos UNC e ATR e biomarcadores do sangue periférico - em controles saudáveis.

	Fascículo Uncinado			Radiação Talâmica Anterior		
	N	r	p	N	r	p
BDNF	38	0,10	0,53	38	- 0,46	0,78
GDNF	38	- 0,85	0,61	38	0,45	0,12
GSK3- β total	38	- 0,83	0,61	38	0,76	0,64
GSK3- β fosforilada	38	0,97	0,05	38	0,21	0,20
Razão GSK3- β	38	- 0,16	0,31	38	- 0,17	0,29

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; GDNF: fator neurotrófico derivado da glia; GSK3- β : glicogênio sintase quinase 3- β ; TAB: transtorno afetivo bipolar.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo de DTI buscou avaliar a integridade dos tratos de SB numa amostra de sujeitos TAB sem tratamento prévio comparado com CS, além de correlacionar dados quantitativos de tratos com alterações na integridade de SB e biomarcadores (BDNF, GDNF e GSK3- β) presentes no sangue periférico, no grupo TAB. Utilizando um método de tractografia automatizado (TRACULA) nós encontramos valores significantes baixo de FA no grupo TAB para dois tratos críticos na regulação da emoção, sendo eles o UNC esquerdo e ATR esquerdo. Apesar de termos visto diferença significativa entre grupos para a expressão plaquetária da T-GSK3- β , P-GSK3- β e a razão-GSK3- β , elas não se correlacionaram de forma significativa com os tratos de SB que tiveram alterações em sua integridade, dentre os sujeitos TAB. Embora não tenhamos achado diferença entre grupos para a concentração de neurotrofinas (BDNF e GDNF) no sangue periférico, nós fomos o primeiro estudo a demonstrar uma correlação positiva significativa entre os valores médios de FA e concentrações no sangue periférico de BDNF para os dois tratos (UNC e ATR) com alterações em sua integridade, para o grupo TAB.

6.1. Alterações de DTI

Os achados tractográficos do nosso estudo são consistentes com achados de estudos de DTI anteriores, que reportaram diminuição no nível de FA em sujeitos TAB sem tratamento prévio comparados a grupos de CS (Niida

et al., 2018; Sprooten et al., 2016; Vederine, Wessa, Leboyer e Houenou et al., 2011), incluindo os tratos UNC e ATR. É importante também dizer que outros estudos de DTI não acharam alterações na circuitaria de tratos que ligam a região CPF às regiões do sistema límbico (Benedetti et al., 2011). Tais diferenças nos achados destes estudos prévios podem estar associados aos fatores de confusão como o próprio tratamento farmacológico para as amostras TAB, que podem influenciar no aumento de variância dos valores de FA (Phillips, Travis, Fagiolini e Kupfer, 2008).

Assim como nos achados da literatura de estudos de DTI em sujeitos TAB, nossos achados de alteração de FA foram restritos ao hemisfério cerebral esquerdo (Almeida et al., 2009; McIntosh et al., 2008). Estes estudos demonstram baixo valor da média de FA, em sujeitos com TAB, no hemisfério cerebral esquerdo para os tratos que conectam as subregiões do CPF (dorsolateral e ventromedial) quando comparados com CS. Estudos que avaliaram lesões cerebrais reportaram que lesões envolvendo a circuitaria CPF esquerdo estavam relacionadas com o desenvolvimento de sintomas depressivos, em sujeitos sadios (Davidson e Irwin, 1999). Hipóteses foram feitas de que o lobo pré-frontal estaria então correlacionado como um mediador de processos comportamentais bem como afetos positivos (Davidson e Irwin, 1999). Os estudos de volumetria cerebral por RM, em sujeitos com transtornos do humor, demonstraram que a presença de lesões cerebrais era mais frequente no hemisfério cerebral esquerdo (Hajek et al., 2008).

Estudos anteriores de DTI também demonstram alterações em subregiões do cíngulo (Benedetti et al., 2011; Wang et al., 2008). O cíngulo é um componente central da circuitaria límbica e alterações estruturais bem como

funcionais, em distintas subregiões do cíngulo, são frequentemente associados nos diferentes transtornos psiquiátricos (Emsell et al., 2013; Li et al., Schuff et al., 2014). Por questões de limitação metodológica, descritas no subitem 6.6, não pudemos detectar alterações em subregiões do cíngulo.

Ainda não se é totalmente compreendido o mecanismo que está por trás da diminuição de valores de FA ao longo dos tratos de SB em sujeitos com TAB. Diversos fatores relacionados à SB podem estar relacionados com a patofisiologia do TAB, incluindo déficit na integridade axonal e na mielinização (Benedetti et al., 2011). Como já descrito anteriormente por Le Bihan (2006), a densidade axonal da SB e o grau de mielinização axonal são tidos também como fatores que influenciam as medidas de difusividade no DTI (Le Bihan, 2006).

6.2. Neurotrofinas no Transtorno Afetivo Bipolar

Dentre os processos e os mensageiros, que participam nas sinalizações que envolvem a dinâmica de homeostasia celular, alguns estudos avaliaram os fatores neurotróficos, como o BDNF e o GDNF, em pacientes com TAB. Estes estudos reportaram uma possível correlação entre os fatores neurotróficos (BDNF e GDNF) e alguns dos mecanismos de reparo de lesões axonais (Barbosa et al., 2011; Husson et al., 2004). No nosso estudo, relatamos concentrações destas duas neurotrofinas com uma grande variabilidade Inter sujeito, também vista em outro estudo com amostra semelhante (Cunha et al., 2008; Machado-Vieira et al., 2007; Palomino et al., 2006). Esta alta variabilidade interindividual pode estar relacionada a variabilidade dos episódios de humor e subtipo de TAB na nossa amostra (Barbosa et al., 2011; de Oliveira et al., 2009).

A média de concentração plasmática do BDNF em nossa amostra é comparável à outras amostras de TAB na literatura que recrutaram pacientes sem tratamento prévio e com idade, duração de doença, semelhantes à nossa amostra (Cunha et al., 2008; Machado-Vieira et al., 2007; Palomino et al., 2006;).

No nosso estudo, não houve diferenças significantes entre TAB e CS para BDNF ou GDNF, indo em direção contrária à nossa hipótese inicial. Estes resultados negativos estão em contraste com os achados da literatura anterior, para o BDNF, tendo em vista que os achados reportados por diversos estudos são de uma diminuição na concentração de BDNF nos sujeitos TAB, durante os episódios de mania ou depressão (Fernandes et al., 2015). No caso do GDNF, há relato de aumento de concentração de GDNF em TAB eutímico comparado a TAB com episódio de mania e a CS (Tunca et al., 2014). No entanto, o estudo de Barbosa et al. (2011) não encontrou diferença significativa entre grupos. Foi sugerido que a concentração de BDNF e GDNF, nos sujeitos TAB, poderia variar de acordo com seu estado clínico (Barbosa et al., 2011; de Oliveira et al., 2009), especialmente na área do CPF (de Oliveira et al., 2009).

Em adição, é notado que em outros estudos que comparam concentrações de GDNF, os pacientes com TAB já haviam realizado algum tipo de tratamento medicamentoso, em algum momento da vida. Logo, é sugestível que as alterações na concentração de GDNF, encontradas em estudos anteriores, possam ser efeitos de confusão provocado pelo uso de medicamento e não somente pelo traço do TAB (Tunca et al., 2014; Takebayashi et al., 2006; Rosa et al., 2006).

Por fim, estudos demonstram que neurotrofinas, tais como o BDNF, possui um mecanismo regulatório da enzima GSK3- β . Na presença do BDNF

ocorre uma inativação da enzima, promovendo então efeitos neuroprotetores (Benedetti et al, 2013) Embora em nosso estudo não tenhamos demonstrado diferença significativa do BDNF entre grupos, é provável que este mecanismo regulatório da enzima GSK3- β esteja, de alguma forma, comprometido em sujeitos com TAB, implicando no mecanismo de reparo de mielina.

6.3. Correlação entre Neurotrofinas e alteração de DTI

Nós conseguimos tirar vantagem da grande variabilidade dos valores de BDNF em nossa amostra TAB para investigar a presença de correlações significantes entre os níveis desta neurotrofina e os valores de FA dos tratos de SB no grupo TAB, em que alterações na integridade de SB foram detectadas para os tratos UNC esquerdo e ATR esquerdo (Fernandes et al., 2014).

O fato de uma correlação direta entre os níveis de BDNF e medida de FA ter sido encontrada para ambos os tratos, UNC e ATR, está de acordo com nossa hipótese inicial de estudo e sugere que alteração na integridade de SB nestes tratos seja presente nas proporções de baixos valores de BDNF. No melhor do nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração de uma correlação entre os biomarcadores de DTI e de BDNF numa amostra de TAB sem tratamento prévio. Tal correlação poderia, por exemplo, refletir as propriedades benéficas do BDNF, no que diz respeito à neuroplasticidade e regeneração de axônios danificados, nos sujeitos TAB (Pfaffenseller, Kapezinski, Gallitano e Klamt, 2018; Husson et al., 2004).

Apesar de estudos *post-mortem* associarem o GDNF a alterações na região CPF (Schloesser, Huang, Klein e Manji, 2008), em nossa amostra, não foi visto correlação significativa com os tratos de SB que demonstraram alterações de FA. É possível que o mecanismo que circunda as alterações vistas nos tratos de SB (UNC e ATR), esteja pouco associado à concentração de GDNF no sangue periférico. Pouco pode ser especulado sobre este achado, tendo em vista a falta de estudos que correlacionam o GDNF com dados de DTI, ao contrário do BDNF. Lembrando que existe inconsistência sobre a informação de que os valores de concentração do GDNF no sangue periférico se correlacionem com os valores de concentração do GDNF no sistema nervoso central (Scola e Andreazza, 2015; Barbosa et al., 2011).

6.4. Enzima GSK3- β no Transtorno Afetivo Bipolar

Estudos propõem que o aumento da atividade da enzima GSK3- β contribua para a patofisiologia de transtornos do humor, como o TAB. Foi visto que o aumento na atividade da enzima GSK3- β está relacionada à diminuição da concentração da fração fosforilada desta enzima, sendo assim, diminuindo também a razão entre as concentrações da fração fosforilada e a T-GSK3- β (Jia et al., 2018).

A média da expressão plaquetária de T-GSK3- β em nossa amostra é semelhante às amostras de estudos anteriores (Souza et al., 2015). Em nosso estudo, houve diferença significativa entre grupos para a T-GSK3- β , onde o grupo TAB obtivera maior valor médio plasmático em relação ao grupo CS. No entanto, a T-GSK3- β é reflexo da expressão de suas frações ativa e fosforilada

(Alabed et al., 2010). Há escassez na literatura para comparação de expressão plaquetária de T-GSK3- β em TAB.

A fração P-GSK3- β teve diferença significativa entre os grupos, demonstrando menor expressão no grupo TAB e maior no grupo CS. Este achado está de acordo com estudos anteriores (Jope, 2011) e com nossa hipótese inicial, tendo em vista que a fosforilação da GSK3- β está associada com a atividade dos mecanismos de mielinização axonal (Muneer, 2017; Scola e Andreazza, 2015; Alabed et al., 2010; Bartzokis, 2012; Jope, 2011; Manji e Lenox, 2000), sendo a baixa integridade dos tratos de SB no TAB um das principais características do TAB (Niida et al., 2018; Sprooten et al., 2016; Vederine, Wessa, Leboyer e Houenou et al., 2011).

Houve também diferença significativa na atividade da enzima GSK3- β entre grupos. O grupo TAB apresenta maior atividade da enzima GSK3- β em relação ao grupo CS, indo de acordo com nossa hipótese inicial. Estudos anteriores relatam que a atividade da enzima GSK3- β está relacionado ao retardo na reparação de axônios desmielinizados (Bartzokis, 2012; Alabed et al., 2010), podendo esta diminuição no mecanismo de reparo dos tratos de SB estar relacionado com parte da patofisiologia do TAB (Scola e Andreazza, 2015). Há escassez na literatura para comparação na expressão plaquetária de atividade de GSK3- β em TAB.

6.5. Correlação entre GSK3- β e Alteração de DTI

Mediante o importante papel da enzima GSK3- β nas vias responsáveis pelos mecanismos neuroprotetivos e de mielinização (fração enzimática

fosforilada), e nas via de inibição destes mecanismos de reparação celular (fração enzimática ativa) (Alabed et al., 2010), correlacionamos a enzima GSK3- β e suas frações com os tratos alterados de SB (UNC e ATR). No grupo TAB, não houve correlações significantes entre a expressão plaquetária da T-GSK3- β , P-GSK3- β e a forma ativa da GSK3- β . Embora estudos demonstrem que uma das características da fisiopatologia do TAB é a alteração na integridade de SB, principalmente na circuitaria CPF-límbico (Bellani et al., 2016), não é visto correlação do mecanismo biológico de atividade da GSK3- β em nossa amostra.

Já no grupo CS, obtivemos correlação positiva significativa entre GSK3- β fosforilada e o trato UNC do hemisfério esquerdo. Estudos anteriores correlacionam o papel biológico da enzima fosforilada na atuação dos mecanismos de neuroproteção conferindo mielinização às estruturas axonais (Muneer, 2017).

Contudo, há escassez na literatura para estudos de correlação de expressão plaquetária de GSK3- β e dados de DTI, em TAB.

6.6. Considerações Metodológicas

Algumas limitações do nosso estudo devem ser destacadas. Em primeiro lugar, um dos achados reportados em estudos de DTI em TAB, é alterações em subregiões do cíngulo (Benedetti et al., 2011; Wang et al., 2008). Em nosso estudo utilizamos o método do TRACULA, que por sua vez, realiza uma média ponderada de valores de FA para todos os voxels contidos no trato, gerando um valor médio de FA para dado trato. Este processo pode ter dificultado uma

possível detecção de alterações de SB relacionado ao TAB nas subregiões do cíngulo em nosso grupo TAB.

A grande variabilidade inter sujeitos das medidas de BDNF e GDNF no nosso estudo, em conjunto com o tamanho modesto de nossa amostra de sujeitos TAB e CS, pode ter colaborado com o baixo poder estatístico e influenciado na falta de resultado significativo na comparação de concentrações de BDNF e GDNF entre grupos (TAB vs CS).

Apesar de conseguirmos correlacionar biomarcador de DTI com o BDNF numa amostra de TAB, não podemos fazer inferências casuais sobre como estas duas variáveis se correlacionam, mediante à natureza deste estudo ser transversal, estudos longitudinais de DTI são necessários para preencher esta lacuna.

A utilização do método TRACULA como forma de análise da microestrutura de SB é um ponto positivo para este estudo. Pois, o método se demonstra robusto, replicativo e não necessita de intervenção por parte do pesquisador durante as etapas de processamento das imagens de RM.

Embora o tamanho da amostra seja modesto é necessário reconhecer que os participantes do grupo TAB deste estudo são livres de tratamento prévio. Este fato garante uma melhor confiabilidade de dados, evitando que estratégias metodológicas, como covariação, sejam utilizadas para controlar o efeito do medicamento na amostra.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo foi capaz de reproduzir achados de estudos prévios, evidenciando uma desconectividade à esquerda da circuitaria CPF-límbica numa amostra com TAB e sem tratamento prévio (Bellani et al., 2016). Nosso estudo não foi capaz de detectar diferenças significantes para os biomarcadores do sangue periférico BDNF e GDNF entre grupos, provavelmente pela variabilidade inter sujeitos e pelo tamanho modesto da amostra. Apesar disto, fomos capazes de demonstrar pela primeira vez uma correlação positiva entre os dados de DTI e BDNF numa amostra com TAB e sem tratamento prévio.

Vimos também como a enzima GSK3- β , bem como suas frações ativa e fosforilada, possuem expressão plaquetária significativamente diferentes entre os grupos. Embora o mecanismo de ação desta enzima esteja relacionado com o reparo da mielinização (fração fosforilada) ou diminuição do mecanismo deste reparo axonal (fração ativa), somente a fração fosforilada obteve correlação positiva com o trato UNC do hemisfério esquerdo cerebral, no grupo CS.

No entanto, novos estudos com amostragem maior e estado do humor homogêneo entre os pacientes são necessários para confirmar estes achados, que podem levar a uma melhor compreensão do papel biológico do BDNF, GDNF e a GSK3- β em transtornos afetivos e seu mecanismo de neuroproteção na SB.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUFF, H.E., et al. White matter–emotion processing activity relationships in youth offspring of bipolar parents. *Journal of affective disorders*, 2019; 243, 153-164.

ADLER CM, DELBELLO MP, STRAKOWSKI SM. Brain network dysfunction in bipolar disorder. *CNS Spectrums*. 2006;11(4):312-320.

ALABED, YAZAN Z., et al. GSK3 β regulates myelin-dependent axon outgrowth inhibition through CRMP4. *Journal of Neuroscience*. 2010;30;5635-5643.

ALMEIDA J.R.C, et al. Abnormally increased effective connectivity between parahippocampal gyrus and ventromedial prefrontal regions during emotion labeling in bipolar disorder. *Psychiatry Res - Neuroimaging*. 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. (2014). Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (5a. ed.; Texto Revisado). **Porto Alegre: Artmed**.

BARBOSA, I. G., et al. Circulating levels of GDNF in bipolar disorder. *Neuroscience Letters*, 2011; 502(2), 103–106.

BARTZOKIS, G. Neuroglialpharmacology: Myelination as a shared mechanism of action of psychotropic treatments. **Neuropharmacology**. 2012.

BAUER, I. E., et al. Reduced white matter integrity and verbal fluency impairment in young adults with bipolar disorder: A diffusion tensor imaging study. **Journal of Psychiatric Research**, 2015; 62, 115–122.

BEAULIEU, J. M., et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2004; 101(14), 5099-5104.

BELLANI M, BRAMBILLA P. Diffusion imaging studies of white matter integrity in bipolar disorder. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**. 2011;20(2):137-140.

BELLANI M, et al. DTI and Myelin Plasticity in Bipolar Disorder: Integrating Neuroimaging and Neuropathological Findings. **Front Psychiatry**. 2016;7.

BENEDETTI F, et al. Lithium and GSK3-B Promoter Gene Variants Influence White Matter Microstructure in Bipolar Disorder. **Neuropsychopharmacology**. 2013; 38(2): 313– 327.

BENEDETTI F, et al. Tract-specific white matter structural disruption in patients with bipolar disorder. **Bipolar Disord**. 2011.

BENEDETTI F, et al. Disruption of white matter integrity in bipolar depression as a possible structural marker of illness. *Biol Psychiatry*. 2011.

BRENNER, C., SHYN, S.I. Diagnosis and management of bipolar disorder in primary care. *Med Clin North Am*. 2014. v. 98, n. 5, p. 1025 – 1048.

BROOKS J, et al. Dorsolateral and dorsomedial prefrontal gray matter density changes associated with bipolar depression. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2009;172(3):200-204.

CATANI, M., e THIEBAUT DE SCHOTTEN, M. A diffusion tensor imaging tractography atlas for virtual in vivo dissections. *Cortex*, 2008; 44(8), 1105–1132.

CICCARELLI, O., CATANI, M., JOHANSEN-BERG, H., CLARK, C., & THOMPSON, A. Diffusion-based tractography in neurological disorders: concepts, applications, and future developments. *The Lancet Neurology*. 2008.

CUNHA, A.B.M, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 2006;398(3):215-219.

D'ADDARIO, C., et al. (2012). Selective DNA Methylation of BDNF Promoter in Bipolar Disorder: Differences Among Patients with BDI and BDII. *Neuropsychopharmacology*, 37(7), 1647–1655.

DAVIDSON RJ, e IRWIN W. The functional neuroanatomy of emotion and affective style. ***Trends Cogn Sci***. 1999;3(1):11-21.

DÁVILA, R. et al. Influence of the catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism on the plasma concentration of catecholamine metabolites and on clinical features in type I bipolar disorder – a preliminary report. ***J. Affect Disord***. 2006. v. 92, p. 277 – 281.

DE OLIVEIRA GS, et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. ***J Psychiatr Res***. 2009.

DOSHI, J., et al. Multi-atlas skull-stripping. ***Academic radiology***, 2013; 20(12), 1566-1576.

EINAT H e MANJI HK. Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. ***Biological psychiatry***. 2006;15;59(12):1160-71.

EMBI, N., RYLATT, D. B., e COHEN, P. Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle: Separation from Cyclic-AMP-Dependent Protein Kinase and Phosphorylase Kinase. ***European Journal of biochemistry***, 1980;107(2), 519-527.

EMSELL L, et al. Limbic and callosal white matter changes in euthymic

bipolar i disorder: An advanced diffusion magnetic resonance imaging tractography study. ***Biol Psychiatry***. 2013;73(2):194-201.

FAEDDA GL, et al. Precursors of bipolar disorders: A systematic literature review of prospective studies. ***Journal of Clinical Psychiatry***. 2015; 76(5): 614 - 624.

FERNANDES, B. S, et al. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker in bipolar disorder: a meta-analysis of 52 studies. ***BMC medicine***, 2015;13(1), 289.

FERNANDES, B.S, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: A systematic review and meta-regression analysis. ***Journal of Psychiatric Research***. 2011;45(8):995-1004.

FERNANDES, B.S, et al. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: A comparative meta-analysis. ***Mol Psychiatry***. 2014.

FIRST, M. B., et al. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (Clinician Version)*. for DSMIV, 1995.

FITZSIMMONS, J., KUBICKI, M., E SHENTON, M. E. Review of functional and anatomical brain connectivity findings in schizophrenia. ***Current Opinion in Psychiatry***, 2013; 26(2), 172–187.

FORLENZA, O. V., et al. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. ***Journal of psychiatric research***, 2011; 45(2), 220-224.

FUJIMURA, H., et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. ***Thrombosis and haemostasis***, 2002; 87(04), 728-734.

HAJEK T, et al. Reduced subgenual cingulate volumes in mood disorders: A meta-analysis. ***J Psychiatry Neurosci***. 2008.

HAMILTON M.A. Rating scale for depression. ***J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*** 1960; 23(56): 56 – 61.

HO, N. F., et al. The Amygdala in Schizophrenia and Bipolar Disorder: A Synthesis of Structural MRI, Diffusion Tensor Imaging, and Resting-State Functional Connectivity Findings. ***Harvard review of psychiatry***, 2019; 27(3), 150-164.

HUSSON I, et al. BDNF-induced White Matter Neuroprotection and Stage-dependent Neuronal Survival Following a Neonatal Excitotoxic Challenge. ***Cereb Cortex***. 2004;15(3):250-261.

INESTROSA N.C. e ARENAS E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. **Nat Rev Neurosci.** 2010;11(2):77-86.

JEURISSEN, B., DESCOTEAUX, M., MORI, S., E LEEMANS, A. Diffusion MRI fiber tractography of the brain. **NMR in Biomedicine**, 2019; 32(4), e3785.

JI A, et al. Tract-based analysis of white matter integrity in psychotic and nonpsychotic bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders.** 2017;209:124-134.

JIA, S., et al. Regulation of Glycogen Content in Astrocytes via Cav-1/PTEN/AKT/GSK-3 β Pathway by Three Anti-bipolar Drugs. **Neurochemical research**, 2018; 43(8), 1692-1701.

JOPE RS. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience.** 2011; 4: 16.

KIM H.W., RAPOPORT S.I., RAO J.S. Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. **Neurobiology of disease.** 2010 Mar 1;37(3):596-603.

KURUMAJI, A., et al. A distinctive abnormality of diffusion tensor imaging parameters in the fornix of patients with bipolar II disorder. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, 2017; 266, 66-72.

LE BIHAN D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Int Congr Ser.* 2006.

MACHADO-VIEIRA R, et al. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode. *Biol Psychiatry.* 2007.

MALETIC, V., e RAISON, C. Integrated Neurobiology of Bipolar Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 2014; 5.

MANJI, H.K. e LENOX, R.H. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2000. v. 48, n. 6, p. 518–30.

MATSUDA, S., et al. Roles of PI3K/AKT/GSK3 pathway involved in psychiatric illnesses. *Diseases*, 2019 7(1), 22.

MARANGONI C, FAEDDA GL, BALDESSARINI RJ. Clinical and Environmental Risk Factors for Bipolar Disorder. *Harv Rev Psychiatry.* 2018;26(1):1-7.

MCINTOSH A.M, et al. White Matter Tractography in Bipolar Disorder and Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2008.

MELLONI EM, et al. Effects of illness duration on cognitive performances

in bipolar depression are mediated by white matter microstructure. ***Journal of Affective Disorders***. 2019;249:175-182.

MENEZES, P. R., et al. Drug and alcohol problems among individuals with severe mental illness in south London. ***The British Journal of Psychiatry***, 1996; 168(5), 612–619.

MORI, S., et al. MRI Atlas of Human White Matter. ***Elsevier***, 2005. 931.

MUNEER, A. Wnt and GSK3 signaling pathways in bipolar disorder: clinical and therapeutic implications. ***Clinical Psychopharmacology and Neuroscience***, 2017; 15(2), 100.

NIIDA R, et al. Aberrant Anterior Thalamic Radiation Structure in Bipolar Disorder: A Diffusion Tensor Tractography Study. ***Front Psychiatry***. 2018.

OISHI, K., et al. Human brain white matter atlas: Identification and assignment of common anatomical structures in superficial white matter. ***NeuroImage***, 2008 43(3), 447–457.

OLDFIELD, R. C. The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh inventory. ***Neuropsychologia***, 1971; 9(1), 97–113.

PALOMINO A, et al. Decreased levels of plasma BDNF in first-episode

schizophrenia and bipolar disorder patients. **Schizophr Res.** 2006.

PICCINNI, A., et al. Decreased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during mixed episodes of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, 2015; 171, 167–170.

PIERPAOLI, C., & BASSER, P. J. Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. **Magnetic Resonance in Medicine**. 1996.

PHILLIPS ML, TRAVIS MJ, FAGIOLINI A, e KUPFER D.J. Medication Effects in Neuroimaging Studies of Bipolar Disorder. **Am J Psychiatry**. 2008;165(3):313-320.

PINTO JV, MOULIN TC, AMARAL OB. On the transdiagnostic nature of peripheral biomarkers in major psychiatric disorders: a systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 2017;83:97-108.

POLYAKOVA, M., et al. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic & quantitative meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, 2015; 174, 432–440.

PFAFFENSELLER B, KAPCZINSKI F, GALLITANO AL, e KLAMT F. EGR3 Immediate Early Gene and the Brain-Derived Neurotrophic Factor in Bipolar Disorder. **Front Behav Neurosci**. 2018.

PHILLIPS ML, et al. Medication Effects in **Neuroimaging Studies of Bipolar Disorder**. *Am J Psychiatry*. 2008;165(3):313-320.

RADAELLI D, SFERRAZZA PAPA G, VAI B, et al. Fronto-limbic disconnection in bipolar disorder. *Eur Psychiatry*. 2015;30(1):82-88. doi:10.1016/J.EURPSY.2014.04.001.

ROSA, A. R., et al. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. *Neuroscience Letters*, 407(2), 2006; 146–150.

SAUNDERS, J. B., et al. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption-II. *Addiction*, 88(6), 791–804.

SIGITOVA, E., et al. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry and clinical neurosciences*, 2017; 71(2), 77-103.

SUTCUBASI, B., et al. Anatomical connectivity changes in bipolar disorder and schizophrenia investigated using whole-brain tract-based spatial statistics and machine learning approaches. *Neural Computing and Applications*, 2019;1-10.

SCHLOESSER, R. J., HUANG, J., KLEIN, P. S., e MANJI, H. K. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. ***Neuropsychopharmacology***, 2008; 33(1), 110.

SCHUFF N, et al. Patterns of altered cortical perfusion and diminished subcortical integrity in posttraumatic stress disorder: An MRI study. ***Neuroimage***. 2011.

SCOLA G. e ANDREAZZA A.C. The role of neurotrophins in bipolar disorder. ***Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry***. 2015 Jan 2; 56:122-8.

SMITH, S. M., et al. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. ***NeuroImage***, 2006; 31(4), 1487–1505.

SPROOTEN E, et al. A comprehensive tractography study of patients with bipolar disorder and their unaffected siblings. ***Hum Brain Mapp***. 2016;37(10):3474-3485.

STRAKOWSKI SM, et al. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. ***Bipolar Disord***. 2012;14(4):313-325.

TAKEBAYASHI, M., et al. Decreased levels of whole blood glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in remitted patients with mood

disorders. ***International Journal of Neuropsychopharmacology***, 2006; 9(5), 607-612.

TUNCA, Z., et al. Alterations in BDNF (brain derived neurotrophic factor) and GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) serum levels in bipolar disorder: the role of lithium. ***Journal of affective disorders***, 2014; 166, 193-200.

VEDERINE F-E, WESSA M, LEBOYER M, HOUENOU J. A meta-analysis of whole-brain diffusion tensor imaging studies in bipolar disorder. ***Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry***. 2011;35(8):1820-1826.

WANG F, et al. Abnormal anterior cingulum integrity in bipolar disorder determined through diffusion tensor imaging. ***Br J Psychiatry***. 2008.

WANG, Z., et al. Association of BDNF Gene Polymorphism with Bipolar Disorders in Han Chinese Population. ***Genes, Brain and Behavior***, 2012; 11(5), 524–528.

WINSTON, G. P. The physical and biological basis of quantitative parameters derived from diffusion MRI. ***Quantitative Imaging in Medicine and Surgery***, 2012; 2(4), 254–265.

WHITEFORD HA, DEGENHARDT L, REHM J, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. 2013;382(9904):1575-1586.

YENDIKI A. Automated probabilistic reconstruction of white-matter pathways in health and disease using an atlas of the underlying anatomy. **Front Neuroinform**. 2011.

YOSHIDA, S., OISHI, K., FARIA, A. V., E MORI, S. Diffusion tensor imaging of normal brain development. **Pediatric radiology**, 2013; 43(1), 15-27.

YOUNG B.R.C., et al. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. **Brit. J. Psychiat**. 1978; 133: 429-35.

ZHANG, X., et al. Effect of treatment on serum glial cell line-derived neurotrophic factor in bipolar patients. **Journal of Affective Disorders**, 2010;126(1–2), 326–329.