**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

BRUNA VALIM DE NICOLA

**Farmacogenética do lítio:
marcadores de refratariedade em pacientes com transtorno bipolar**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2019

BRUNA VALIM DE NICOLA

**Farmacogenética do lítio:
marcadores de refratariedade em pacientes com transtorno bipolar**

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

Área de concentração: Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**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

Nicola, Bruna Valim de
Farmacogenética do lítio : marcadores de
refratariedade em pacientes com transtorno bipolar
/ Bruna Valim de Nicola. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.
Orientador: Wagner Farid Gattaz.

Descritores: 1. Transtorno bipolar 2. Lítio
3. Polimorfismo de nucleotídeo único 4. Refratariedade
5. Farmacogenética

USP/FM/DBD-019/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nicola BV. Farmacogenética do lítio: marcadores de refratariedade em pacientes com transtorno bipolar [mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2019.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Ao meu pai Daniel, pelo amor incondicional, por tudo que fez para que meus sonhos sempre se concretizassem e pelo apoio nesta jornada, mesmo que parte dela tenha sido longe de seus braços.

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca me abandonar e olhar por mim a cada passo que dou.

Aos meus pais Daniel e Vera e meu irmão Felipe, pilares em minha vida, obrigada por toda força que me deram, paciência e amor doados. Nunca deixaram de acreditar que sou capaz até daquilo que se diz impossível.

Ao meu marido Eduardo, amigo e parceiro que me levanta quando caio que chora meu choro, que comemora minhas conquistas sempre me dizendo que mereço tudo aquilo pelo qual lutei. Obrigada por ser o melhor marido e pai para o nosso filho.

Ao meu filho Daniel (Titi), luz da minha vida, que me inflama, que me faz sorrir sem motivo, que me faz querer ser sempre minha melhor versão para ele, por ele. Obrigada por me escolher para ser sua mãe.

A toda minha família, Valins, Nicolas, Bertins Cabral, por tanto amor. Não poderia querer família melhor.

A todos meus amigos, em especial a Marina por ser irmã, Bruninha por ser meus pés no chão, Alinzinha por ser amor, Flávia por ser parceira, Beide por ser meu ombro amigo e Ana por me fazer rir da vida e com a vida.

A toda família LIM-27 por aturarem minhas besteiras e rirem junto comigo, em especial as meninas que sempre me ajudaram sem medir esforços, à Leda por toda ajuda e orientação. A todos meus mais sinceros “efcharistó”.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz pela confiança e por me dar a satisfação em ser sua aluna.

Aos ambulatórios GRUDA e AMBAN, aos pacientes, à farmácia e ao arquivo médico por permitirem que este trabalho fosse realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa concedida - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte e contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, sejam eles com incentivos, cafés, palavras de amor, conselhos e puxões de orelha. MUITÍSSIMO obrigada.

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água
no mar. Mas o mar seria menos se lhe
faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

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 figuras
Lista de tabelas
Lista de abreviaturas
Lista de símbolos
Lista de siglas
Resumo
Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Lítio	2
1.1.1	Efeitos neuroprotetores do lítio	3
1.1.2	Efeitos colaterais do lítio	10
1.2	Refratariedade.....	11
1.2.1	Escala ALDA.....	14
1.3	Farmacogenética.....	14
1.3.1	GSK3 β (<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>)	17
1.3.2	BDNF (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)	17
1.3.3	NTRK2 (<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2</i>)	18
1.3.4	CREB (<i>cAMP response element-binding protein</i>)	18
2	OBJETIVOS	19
3	DESENHO	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Casuística.....	21
4.2	Preparo de amostra.....	22
4.3	Análises das amostras - PCR em tempo real - sistema <i>TaqMan</i> ®.....	22
4.4	Genes e polimorfismos investigados.....	24
4.5	Análises estatísticas.....	26
5	RESULTADOS	26
5.1	Padronização	27
5.2	Análise das amostras totais e submostra ALDA.....	29
5.2.1	GSK3 β (rs334558)	29
5.2.2	CREB1-1H (rs1050641)	32
5.2.3	CREB1-7H (rs2551919)	32

5.2.4	<i>BDNF</i> (rs6265)	34
5.2.5	<i>NTRK2</i> (rs1387923)	37
6	<i>Análise de associação entre os polimorfismos</i>	40
7	DISCUSSÃO	41
8	CONCLUSÕES	47
9	ANEXOS.....	49
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	APÊNDICE	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação intracelular do lítio.	4
Figura 2 – <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – SNPs.	15
Figura 3 – Processo de recrutamento dos pacientes com TB em tratamento com lítio.	21
Figura 4 – PCR em tempo real – sistema <i>TaqMan</i> ®.	24
Figura 5 – Amplificação de fragmentos heterozigotos em PCR em tempo real.	28
Figura 6 – Amplificação de fragmentos homozigotos em PCR em tempo real.	28
Figura 7 – Amplificação de fragmentos homozigotos em PCR em tempo real.	29
Figura 8 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado de <i>GSK3β</i>	31
Figura 9 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado de <i>CREB1-7H</i>	34
Figura 10 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado do gene <i>BDNF</i>	37
Figura 11 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado de <i>NTRK2</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes e polimorfismos relacionados à farmacodinâmica do lítio...	25
Tabela 2 – Dados sóciodemográficos da casuística estudada com aplicação das escalas HDRS e YMRS	26
Tabela 3 – Dados sóciodemográficos da casuística estudada com aplicação da escala ALDA.....	27
Tabela 4 – Análise de associação entre os polimorfismos investigados	40

LISTA DE ABREVIATURA

ECT	Eletroconvulsoterapia
-----	-----------------------

LISTA DE SÍMBOLOS

Na ⁺	Sódio
Li ⁺	Lítio
Ca ²⁺	Cálcio
β	Beta

LISTA DE SIGLAS

TB	Transtorno Bipolar
GSK3 β	<i>Glycogen-Synthase Kinase 3</i> - Glicogênio-Sintase Quinase 3
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
NTRK2	<i>Tyrosine Kinase Type 2 Neurotrophic Receptor</i> – Receptor Neurotrófico de Tirosina Quinase Tipo 2
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i> – Proteína ligada ao elemento de resposta cAMP
DSM-IV-TR	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- 4</i> – Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais – 4
TB-SOE	Transtorno Bipolar Sem Outra Especificação
PI	<i>Phosphoinositide</i> – Fosfoinositol
AC	Adenilato Ciclase
PKC	<i>Protein Kinase C</i> – Proteína Quinase C
PLC	<i>Phospholipase C</i> - Fosfolipase C
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba sódio-potássio
IP2	<i>Inositol Biphosphate</i> - Inositol Bifosfato
IP3	<i>Inositol Triphosphate</i> - Inositol Trifosfato
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i> - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
DAG	<i>Diacylglycerol</i> – Diacilglicerol
IPPase	<i>Inositol Poliphosphatase</i> - Polifosfatase de Inositol
IMPase	<i>Inositol Monophosphatase</i> – Monofosfatase de Inositol
NMDA	<i>N-methyl- D- aspartate</i> – N-metil-D-aspartato
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> – Adenosina Monofosfato Cíclico
PKA	<i>Protein Kinase A</i> – Proteína Quinase
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> – Fosfoinositol 3-Quinase
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
Akt	Protein Kinase B – Proteína Quinase B

HSP70	<i>70 Kilodalton Heat Shock Proteins</i> – Proteína de Choque Térmico de 70 QuiloDaltons
JNK	<i>C-Jun N-terminal Kinase</i> - Quinase N-terminal de c-Jun
p38	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
AP-1	<i>Activator Protein 1</i> – Proteína Adaptadora 1
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2 - Células B de Linfoma 2
Bax	<i>BCL2 Associated X</i> – BCL2 Associado a X
p53	<i>Protein 53-mediated apoptosis</i> – Proteína 53 – Indutor de Apoptose
ERK1/2	<i>Extracellular signal – regulated protein kinases 1 and 2</i> – Proteínas Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares 1 e 2
HDRS	<i>Hamilton Depression Rating Scale</i> – Escala de Avaliação de Depressão Hamilton
MADRS	<i>Montgomery-Asberg Depression Scale</i> - Escala de Depressão Montgomery-Asberg
MRS	<i>Modified Rankin Scale</i> – Escala Modificada de Rankin
YMRS	<i>Young Mania Rating Scale</i> – Escala de Avaliação de Mania Young
GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i> – Estudo de Associação Ampla do genoma
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Único Nucleotídeo
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i> – Pacote Estatístico para Ciências Sociais
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia de Polimerase
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> – Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ECA	<i>Epidemiological Catchment Area</i> - Estudo da Área de Captação Epidemiológica do Instituto Nacional de Saúde Mental
ConLiGen	The International Consortium on Lithium Genetics

RESUMO

Nicola BV. *Farmacogenética do lítio: marcadores de refratariedade em pacientes com transtorno bipolar [dissertação]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Os sais de lítio são utilizados no tratamento dos transtornos do humor há mais de 50 anos. É a principal medicação prescrita para pacientes com diagnóstico de transtorno bipolar (TB). No entanto, aproximadamente 70% dos pacientes não respondem satisfatoriamente, ou seja, são refratários ao tratamento com lítio. Tendo em vista a importância do uso do lítio no tratamento de TB e a influência de fatores genéticos na variabilidade da biodisponibilidade do medicamento e em seus efeitos (95%), é de extrema importância esclarecer o papel da farmacogenética envolvida na resposta ao lítio. O objetivo deste trabalho foi detectar possíveis marcadores genéticos em pacientes com TB para melhor predição da resposta à terapia medicamentosa. Para tanto, estudamos os polimorfismos dos genes relacionados ao mecanismo de ação do lítio: *glicogênio- sintase quinase 3 – beta (GSK3 β)*, *fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)*, *Receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo 2 (NTRK2)* e *proteína ligada ao elemento de resposta cAMP (CREB)* em pacientes bipolares respondedores e refratários ao tratamento com lítio com fenótipo determinado por escalas HDRS e YMRS, e análise dos prontuários, e escala ALDA. Na nossa amostra, os polimorfismos *CREB1-1H (G>A)*, *CREB1-7H (C>T)*, *BDNF (rs6265 - G>A)* e *NTRK2 (rs1387923 - T>C)* não apresentaram associação significativa dos genótipos com a resposta à terapia com lítio. Para os resultados obtidos na análise genotípica correspondente ao polimorfismo rs334558 (C>T) do gene *GSK3 β* , verificamos maior incidência do genótipo heterozigoto CT em pacientes respondedores e maior incidência do genótipo polimórfico homozigoto TT em pacientes refratários. Para a metodologia ALDA, não obtivemos diferenças que relacionassem os

polimorfismos selecionados a refratariedade ao lítio. Acreditamos que o pequeno número amostral incluídos em nosso estudo pode ter prejudicado a determinação desses polimorfismos na resposta ao lítio.

Descritores: transtorno bipolar; lítio; polimorfismo de nucleotídeo único; refratariedade, farmacogenética.

ABSTRACT

Nicola BV. *Pharmacogenetics of lithium: markers of refractoriness in patients with bipolar disorder* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;" 2019.

Lithium salts have been used in the treatment of mood disorders for more than 50 years. It is the main medication prescribed for patients diagnosed with bipolar disorder (BD). However, approximately 70% of the patients do not respond satisfactorily, that is, they are refractory to treatment with lithium. Given the importance of using lithium in the treatment of BD and the influence of genetic factors on the variability of the bioavailability of the drug and its effects (95%), it is extremely important to clarify the role of pharmacogenetics involved in the lithium response. The goal of this study was to detect possible genetic markers in BD patients to better predict the response to drug therapy. In order to do so, we studied the polymorphisms of genes related to the mechanism of action of lithium: glycogen synthase kinase 3 - beta (GSK3 β), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) tyrosine kinase type 2 neurotrophic receptor (NTRK2) and cAMP response element-binding protein (CREB) in responders and refractory bipolar patients that used lithium in the treatment. The phenotype was determined by HDRS and YMRS scales, and analysis of charts, and ALDA scale. In our sample, the polymorphisms CREB1-1H (G> A), CREB1-7H (C> T), BDNF (rs6265 - G> A) and NTRK2 (rs1387923 - T> C) had no significant association of genotypes with the response to lithium therapy. For the results obtained in the genotype analysis corresponding to the polymorphism rs334558 (C> T) of the GSK3 β gene, we verified a higher incidence of the heterozygous

CT genotype in responding patients and a higher incidence of the polymorphic homozygous TT genotype in refractory patients. For the ALDA methodology, we did not obtain differences that related the selected polymorphisms to refractoriness to lithium. We believe that the small sample size included in our study may have impaired the determination of these polymorphisms in lithium response.

Descriptors: bipolar disorder; lithium; polymorphism, single nucleotide; refractoriness; pharmacogenetics.

1 INTRODUÇÃO

O transtorno bipolar (TB) é uma doença progressiva e crônica caracterizada por oscilações de humor com episódios de mania ou hipomania e depressão (Kim et al., 2017). Conforme critérios do DSM-IV-TR (APA, 2002), os transtornos bipolares fazem parte dos transtornos do Eixo I e dividem-se em TB-I, caracterizado pelos episódios maníacos, depressivos ou mistos, TB-II caracterizado pelos episódios de hipomania e depressão e transtorno ciclotímico caracterizado pelos episódios de hipomania menores que 4 dias e episódios recorrentes de depressão, além dos transtornos do humor bipolar sem outra especificação (TB-SOE) (APA, 2002; Alcantara et al., 2003; Pereira et al., 2010). Segundo a DSM-V, o diagnóstico baseia-se na identificação de sintomas de mania ou hipomania e da avaliação do curso longitudinal da doença (APA, 2014). No entanto, o diagnóstico do TB é complexo uma vez que a doença é capaz de apresentar semelhanças clínicas e genéticas com outras doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia, principalmente quando acompanhada de sintomas psicóticos (Davila et al., 2006), além dos episódios depressivos confundidos com a própria depressão (Brenner et al., 2014).

A prevalência do TB na população é de 3 a 5% (Kessler et al., 2005; Pfennig et al., 2013; Manchia et al., 2013), apresentando um índice de 9% - 15% de suicídio entre os pacientes (Johnson et al., 2012). Os custos diretos e indiretos do TB, nos Estados Unidos são estimados em 15 bilhões de dólares (Begley et al., 2001) representando-se como uma doença associada a altos custos, com elevados índices de morbidade e mortalidade, especialmente entre casos que se manifestam precocemente (Post et al., 2010). Além destas características, o TB por vezes é acompanhado de prejuízos no funcionamento cognitivo, comportamental, educacional, vocacional e interpessoal (Dilsaver et al., 2011; Faedda et al., 2014; Leverich et al., 2007).

Além de apresentar-se como uma doença multifatorial, é sabido que fatores genéticos estão envolvidos no TB e estima-se que a herdabilidade da doença seja de 60% a 85% (Doherty et al., 2014; Winham et al., 2014). O TB apresenta características poligênicas (ou seja, mais de um gene é responsável

por determinadas características) e podem ser causados por complexas alterações genômicas. Apesar da contínua busca de marcadores genéticos que predisponham ao TB e da descoberta de alguns genes associados à doença, mais estudos se fazem necessários para associá-los ao TB (McMahon et al., 2005).

1.1 Lítio

Para o tratamento do transtorno bipolar, são utilizados fármacos chamados estabilizadores do humor, associados ou não a antidepressivos, anticonvulsivantes, antipsicóticos atípicos e terapia eletroconvulsiva (ECT). Essas intervenções são indicadas para tratamento em casos de mania e/ou depressão, com atuação profilática na inibição destes episódios (Rybakowsky, 2014). Estes sintomas recorrentes do TB, geralmente são tratados com sucesso, mas a taxa de recaída ainda é alta. Portanto, a prevenção de recaída é importante para minimizar não só os danos causados pela doença, mas também o risco de suicídio (Geddes et al., 2004).

O lítio ocupa a posição de estabilizador do humor de primeira linha, sendo utilizado como a principal abordagem terapêutica para prevenção de episódios recorrentes de mania aguda e de suicídio (Goodwin, 2003; Tondo e Baldessarini, 2009).

Os sais de lítio são utilizados no tratamento dos transtornos do humor há mais de 50 anos. Seu efeito antimaníaco foi primeiramente observado pelo psiquiatra australiano, John Cade, há 67 anos, e seu sucesso foi constatado após tratamento de 10 pacientes em estado de mania com observação da melhora dos sintomas (Cade, 1949). Mais tarde, sua eficácia como estabilizador do humor pôde ser descrita e comprovada em inúmeros ensaios clínicos. O primeiro estudo randomizado desenvolvido por Schou et al. (1954), revelou a eficiência do uso de lítio como tratamento do transtorno bipolar e uma alternativa para a eletroconvulsoterapia (ECT) no tratamento de mania. Em outro estudo, Geddes et al. (2004) publicaram uma meta-análise que

demonstrou a eficiência do lítio na redução do risco de recaída para episódios de mania (38%) e episódios de depressão (28%).

1.1.1 Efeitos neuroprotetores do lítio

Como íon de proporções pequenas, o lítio penetra facilmente em neurônios, bem como em células do músculo esquelético e liso interagindo com diversas moléculas intracelulares (Li et al., 2012). Seu transporte através da membrana celular ocorre por diversas maneiras, sendo o principal meio por transporte passivo via canal de voltagem de sódio (Na^+). A entrada por esta via (Na^+/Li^+) ocorre devido à mesma permeabilidade do canal para ambos os cátions (El-Mallakh, 2004; Komoroski e Pearce, 2008). Outra via de transporte do lítio, assim como sua ação no interior das células e membrana plasmática, se dá por meio da competição com íons de magnésio ligados a diversas enzimas, transportadores e proteínas regulatórias. Isso ocorre devido a semelhança iônica do lítio ao magnésio (Komoroski e Pearce, 2008).

Sabe-se que o lítio atua em uma série de sistemas de neurotransmissores, regulação hormonal e circadiana, transporte de íons, expressão gênica e de mecanismos de transdução de sinais, tais como a hidrólise de fosfoinositol (PI), adenilato ciclase (AC), proteínas G, glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), proteína quinase C (PKC), entre outras. Acredita-se que tais efeitos sejam responsáveis por mudanças na modulação neural. Todavia, os mecanismos pelos quais o lítio exerce seus efeitos neurotróficos e neuroreparadores ainda não foram completamente elucidados (Williams e Harwood, 2000; Alda, 2015). O efeito mais descrito do lítio é a fosforilação da GSK3 β e PKC, alterando a atividade dessas quinases que modificam proteínas do citoesqueleto, levando a alterações nos sistemas de neurotransmissão, neurocircuito e neurocognição associados à estabilização do humor (Lenox e Hahn, 2000). Além disso, levam à ativação de vias neurotróficas e neuroprotetoras, conforme demonstrado em estudos humanos pré-clínicos com lítio (Chiu e Chuang, 2010).

Os estudos identificam como principais alvos moleculares do lítio (Figura 1):

FONTE: Adaptado de Chiu e Chuang (2010).

Figura 1 – Mecanismo de ação intracelular do lítio. O lítio tem como primeira ação a inibição direta e indireta da atividade de GSK3β via ação PI3K-dependente de PKC e cAMP-dependente de ativação de PKA. Estas inibições levam a ativação de vários fatores de transcrição, incluindo CREB, HSF-1 e β-catenina e subsequente de proteínas citoprotetoras tais como BDNF, VEGF, HSP70 e Bcl-2. GSK3β é regulada negativamente pela ativação do receptor inativo Wnt, causando a diminuição da atividade da GSK3β e redução da atividade da proteína pró-apoptótica p53 e seu efeito de subativação em Bcl-2. A inibição de GSK3β permite a ativação de fatores neurotróficos induzidos por lítio, como BDNF, ativado por seu receptor NTRK2 na superfície celular, e as vias PI3K / Akt e MEK / ERK. Ambos os caminhos estão fortemente associados aos efeitos neuroprotetores, que estimulam CREB e inibe GSK3β. A indução de BDNF é um passo essencial para a neuroproteção contra a excitotoxicidade do glutamato e pode contribuir para a neurogênese induzida por lítio. Em terceiro lugar, o lítio inibe

o receptor de NMDA mediado pelo influxo de cálcio, consequentemente inibindo a ativação de JNK (proteína responsável por regular a apoptose), p38 quinase e fator de transcrição AP-1. A atividade de JNK (proteína envolvida no controle apoptótico) também é inibida pela super-expressão do HSP70 (proteína com propriedade anti-inflamatória). Além disso, por meio da depleção de inositol, o lítio reduz o IP3 e, consequentemente, a liberação de cálcio. A inibição intracelular de cálcio suprime o estresse celular.

- Regulação da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e fluxo de íons

Desponta a hipótese de que o lítio seja capaz de diminuir a concentração irregular de sódio intracelular, levando à sua normalização em pacientes em mania aguda, sendo assim possível a renovação do gradiente eletroquímico de sódio através da membrana plasmática e do potencial de membrana em repouso (El-Mallakh, 2004). O lítio atua ainda na regulação da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ que em casos de mania e depressão bipolar apresenta atividade diminuída (Keltner e Steele, 2015).

Episódios de mania possivelmente estão associados a um aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), aumento de neurotransmissores na célula e aumento da estimulação da membrana pós-sináptica. Já nos episódios depressivos ocorrem a diminuição da atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ em razão da redução das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , IP2 (inositolbifosfato) e aumento da produção de IP3 (inositol trifosfato) (Vosahlikova e Svoboda, 2016).

- Depleção do Inositol

A via de sinalização do inositol ocorre por meio de receptores acoplados à proteína G. Uma vez ativada, esta via leva à hidrólise de PIP2 (fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato) via enzima fosfolipase C (PLC) produzindo IP3 (inositol trifosfato), usado na produção de inositol e DAG (diacilglicerol) (Toker e Agam, 2014).

A hipótese de depleção do inositol foi introduzida por Berridge et al. (1989). Em seu trabalho, foi sugerido que o efeito do lítio como estabilizador do humor é mediado pelo seu efeito inibitório sobre várias enzimas no ciclo do fosfoinositol (PI), principalmente por uma inibição não competitiva da monofosfatase de inositol (IMPase) e polifosfatase de inositol (IPPase). Estas

moléculas têm papel importante no que diz respeito à transmissão de sinal intracelular, via receptores acoplados à proteína G. Esta ação impede que o inositol seja reciclado e, por conseguinte, acarretando na diminuição da concentração de inositol livre, interferindo na sinalização celular mediada por IP3 e subsequentemente em moléculas responsáveis por transmissões de sinais (Ca^{2+} e PKC) mediadas por este componente (Berridge, Downes e Hanley, 1982).

O lítio, por ser inibidor não competitivo de IMPase, tem sua ação diretamente mediada pela concentração de inositol, ou seja, o grau de inibição depende tanto do inibidor quanto do substrato: quanto mais substrato disponível, maior é a ação operada pelo inibidor. Isso explicaria um dos efeitos do lítio como estabilizador do humor (Williams e Harwood, 2000).

- Inibição da sinalização do glutamato mediada pelo receptor NMDA (N-methyl-D-aspartate)

É sabido que em condições normais o neurotransmissor glutamato exerce papel importante na plasticidade sináptica, aprendizado e memória. Em pacientes com TB, este neurotransmissor encontra-se aumentado durante fases de mania, levando a excitotoxicidade nos neurônios (Vosahlikova e Svoboda, 2016; Nikolaus et al., 2003).

Também se tem descrito que a ativação do receptor NMDA de glutamato é impedida pelo magnésio que se liga a ele, sendo este receptor ativado quando da ligação simultânea de glutamato e glicina e a consequente substituição do magnésio (Tsapakis e Travis, 2002). A administração crônica de lítio incorre numa competição com o magnésio o que leva à inibição do receptor NMDA de modo que a excitotoxicidade induzida pelo glutamato seja suprimida e impedindo assim a atrofia dos neurônios e sua degradação. Parte desta inibição advém da inibição do influxo de cálcio mediado pelo receptor NMDA (Hashimoto et al., 2002).

- Alterações de segundos mensageiros responsáveis pela neurotransmissão da dopamina

Dopamina é um importante neurotransmissor excitatório de vias responsáveis pela estimulação das funções cerebrais. A ação pós-sináptica desta substância é mediada por receptores acoplados à proteína G, levando à estimulação do sistema de segundos mensageiros como adenilato ciclase (AC), monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) que, posteriormente, modulam a neurotransmissão (Manji e Lenox, 2000). Há hipóteses de que este neurotransmissor esteja desregulado no TB, apresentando-se elevado em fases de mania, o que resulta em alterações na via de sinalização (Ashok et al., 2017). Nesse sentido, estudos sugerem que a administração crônica de lítio altera o funcionamento destes segundos mensageiros, mas sem alterações nas concentrações dopaminérgicas (Manji e Lenox, 2000).

- Inibição da proteína Gi e estimulação de adenilato ciclase (AC)

A adenilato ciclase está acoplada à região da membrana e intimamente associada a proteína G que, a depender de seu subtipo pode estimular (Gs) ou inibir (Gi) a produção de cAMP e então ativar PKA (proteína quinase A), que, por sua vez, regula canais iônicos fosforilados, citoesqueleto e fatores de transcrição, tais como proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB) (Quiroz et al., 2010).

Atuando nessa via de transdução de sinal, o lítio, em concentrações de 2 mmol/L, é capaz de aumentar os níveis basais de AC e cAMP, em parte pela inibição da proteína Gi, além de equilibrar o superestímulo celular reduzindo atividade de Gs, conferindo estabilidade ao sistema de segundo mensageiro (Marmol, 2008; Brunello e Tascedda, 2003).

Com uso prolongado de lítio, estes efeitos eventualmente acarretam modificações transcricionais em genes relacionados à AC (Mann et al., 2009)

- Diminuição de PKC (proteína quinase C)

Proteínas quinase C são isoenzimas abundantemente expressas no cérebro e influenciam a sinalização neuronal a curto prazo (liberação de neurotransmissores e fluxos iônicos), a médio prazo (regulação de receptor), e a longo prazo (proliferação celular, remodelação sináptica e expressão gênica)

(Saxena et al., 2017). A ativação da PKC ocorre por mediação de neurotransmissores regulados por PI3K (fosfoinositol 3-quinase). Já foi descrito um aumento da atividade de PKC durante intensa neurotransmissão, como em episódio de mania. Em estudo *post-mortem*, foram encontrados elevados níveis de PKC no cortex préfrontal de pacientes com transtorno bipolar, prejudicando o funcionamento neuronal. O lítio diminui a atividade desta quinase, permitindo um reajuste no desempenho dos neurônios (Manji et al., 1996).

- *Inibição de glicogênio-sintase quinase – β (glycogen-synthase kinase – 3 - GSK3 β)*

GSK3 β é uma importante enzima envolvida em múltiplas vias de sinalização. Foi primeiramente associada à regulação da enzima glicogênio sintase e posteriormente descobriu-se sua ação na regulação da expressão gênica, desenvolvimento embrionário, ritmo circadiano, desenvolvimento e sobrevivência neuronal, entre outras funções (Embi et al., 1980; O'Brien e Klein, 2009). Tem como alvos inibitórios fatores de transcrição, moléculas envolvidas na sinalização do glutamato e vias Wnt (*Wingless-related integration site*).

A via Wnt de sinalização está envolvida em muitas funções celulares (Clevers, 2006). Nesta via, o principal substrato da GSK3 β é a proteína β -catenina, proteína responsável, juntamente com Akt (proteína quinase B) pela inibição de GSK3 β (Jope, 2003). GSK3 β ativada tem por finalidade fosforilar β -catenina levando à sua degradação. A ativação da via Wnt inibe a GSK3 β , bloqueando a degradação da β -catenina e resultando em aumento da expressão de genes dependentes da ativação de β -catenina (Can, Schulze e Gould, 2014).

Em concentrações terapêuticas, o lítio tem capacidade de inibir a atividade de GSK3 β pela fosforilação da serina na porção N-terminal da molécula (inibição indireta). Em níveis terapêuticos, o lítio atua inibindo GSK3 β pela competição com íons magnésio acarretando o bloqueio da atividade catalítica de GSK3 β (inibição direta) (Grimes e Jopes, 2001). Esta ação inibitória promove o aumento de fosforilação e ativação de Akt resultando na

redução de moléculas pró-apoptóticas, mecanismo este mediado pela estimulação da proteína β -catenina (Beualieu, 2012).

- Diminuição de fatores pró-apoptóticos

Estudos demonstraram que o lítio é capaz de prevenir apoptose (processo de morte celular) em hipocampo por meio de ativação de vias neuroprotetoras e anti-inflamatórias (aumento da expressão de HSP70). Este processo ocorre pela inibição de quinases como JNK (quinase N-terminal de c-Jun) e p38 ativada por mitógeno (Shaulian e Karin, 2002). Estas proteínas tem sua ativação por fosforilação em resposta a estímulos apoptóticos, induzindo aumento da transcrição de AP-1 (proteína ativadora – 1), proteína responsável pelo controle da proliferação celular, diferenciação e apoptose. Em tratamento a longo prazo, o lítio atua na inibição destas quinases e, por conseguinte, inativação do processo de morte celular (Chen et al., 2003)

Assim como quinases, células B de linfoma 2 (Bcl-2) são importantes na regulação da apoptose. A Bcl-2 desempenha um importante papel anti-apoptótico por meio da inibição da liberação de Bax (fator pró-apoptótico) das mitocôndrias (Chen e Chuang, 1999). Este efeito neuroprotetor ocorre devido à regulação positiva de Bcl-2 por lítio que atua contra a excitotoxicidade do glutamato, impedindo que a expressão de fatores pró-apoptóticos como p53 e Bax induzidos por glutamato ocorra (Malhi e Outhred, 2016; Chen e Chuang, 1999).

- Regulação da atividade do fator de transcrição CREB (cAMP response element-bindingprotein)

CREB é uma proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (conhecido como CRE), importante fator de transcrição regulado por GSK3 e PKA/cAMP (Salloum et al., 2014). Sua ativação ocorre por intermédio de fatores de crescimento, influxo de cálcio, adenilato ciclase e pela via MEK/ERK importante na regulação da função neuronal, plasticidade sináptica e sobrevivência. CREB fosforilado e ativado atuará em funções de expressão

gênica e sobrevivência celular, além de destacar-se por ser importante no aumento da expressão de BDNF (brain-derived neurotrophic factor – fator neurotrófico derivado do cérebro), fatores anti-apoptóticos e redução de fatores pró-apoptóticos (p-53 e Bax) (Boer et al., 2008; Chen e Chuang, 1999; Walton e Dragunow, 2000; Grewal, York e Stork, 1999).

O tratamento com lítio aumenta a fosforilação de CREB permitindo maior ativação e aumento da atividade de transcrição gênica. Além disso, a inibição de GSK3 β induzida por lítio também leva a ativação de CREB (Grimes e Jope, 2001).

- Aumento da expressão de BDNF

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) é a principal neurotrofina do cérebro responsável pela regulação das atividades neuronais, diferenciação e sobrevivência. Para exercer suas funções é necessário que esta proteína se ligue ao seu receptor NTRK2 (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2*). Quando ligada, é responsável por iniciar inúmeras cascatas de sinalização como via PI3K/Akt e a via ERK1/2, ambas envolvidas na regulação do fator de transcrição para controle da expressão gênica (Mai, Jope e Li, 2002).

Monteleone et al. (2008) mostrou que baixas concentrações séricas de BDNF, está associada à diversas desordens psiquiátricas, principalmente depressão unipolar e transtorno depressivo maior.

Diversos estudos têm demonstrado a ação do lítio em aumentar as concentrações de BDNF intracelular (Manji e Quiroz, 2003).

1.1.2 Efeitos colaterais do lítio

O lítio, apesar de sua eficácia, possui uma faixa terapêutica estreita, elevando-se os riscos de intoxicação. Logo, sua administração deve ser cautelosa e monitorada, principalmente durante os três primeiros meses de administração (Machado-Vieira, 2017). Deste modo, para que se obtenha evolução no tratamento, é necessário acompanhamento não somente do perfil clínico clássico, mas também da resposta à terapia farmacológica, identificando

assim pacientes respondedores e não respondedores (refratários) (Salloum et al., 2014).

Adicionalmente a este controle, é fundamental o acompanhamento da litemia. Níveis séricos abaixo do limite podem aumentar os riscos de episódios maníacos e/ou depressivos, já níveis elevados podem provocar efeitos colaterais (Lima et al., 2005) que, na maioria das vezes, levam ao abandono do tratamento (Goodwin, 2003).

Para maior segurança, a administração do lítio deve ser feita dentro da faixa terapêutica recomendada, mantendo níveis séricos entre 0,6 a 1,2 mmol/L. Sintomas como: tremor, náuseas, diarreia, vertigem e confusão, geralmente estão associados a níveis séricos acima de 1,5 mmol/L (American Psychiatric Association, 2002).

Embora a maioria das diretrizes recomende a prescrição de lítio como um fármaco de primeira linha para o tratamento do TB, seu uso tem diminuído, principalmente por razões acerca de sua segurança clínica (Young et al., 2007). Na verdade, além da janela terapêutica estreita existem outras preocupações relacionadas com a prescrição do medicamento, tais como a exigência de coletas frequentes para verificação dos níveis séricos, a avaliação da incidência de efeitos adversos potencialmente incapacitantes (ex. sede, alteração gustativa, tremor, poliúria, ganho de peso), o risco de teratogenicidade, e a possibilidade de surgimento de lesões orgânicas (ex. insuficiência renal, disfunção tubular renal, hipotireoidismo, hiperparatireoidismo) particularmente com o uso em longo prazo. Na realidade, a disfunção renal tem sido apontada como uma das principais preocupações dos médicos que prescrevem derivados de lítio (Young et al., 2007; Grandjean et al., 2009).

1.2 Refratariedade

A maioria dos pacientes em tratamento com lítio tendem a apresentar recaídas dos sintomas de mania e depressão além de efeitos adversos (Geoffroy et al., 2014). Apenas 30% dos pacientes em tratamento crônico com

lítio, apresentam resposta clínica adequada e total remissão dos sintomas associados ao TB. (Pisani, Melis e Squassina, 2016). A variabilidade na resposta ao medicamento pode ser atribuída a múltiplos fatores genéticos e ambientais (Clayton et al., 2006).

Estima-se que a genética pode ser a razão de 20% a 90% da variabilidade na biodisponibilidade do medicamento e em seus efeitos (Kerb et al., 2006). De acordo com Zhou et al. (2008), diferenças funcionais em genes que codificam enzimas metabolizadoras, transportadores e receptores celulares de medicamentos estão associados à variação na depuração (*clearance*) do medicamento e na resposta terapêutica. Essas diferenças são frequentemente relevantes entre membros de uma mesma população (Kerb et al., 2006). Assim sendo, medicamentos que são eficazes ou bem tolerados por algumas pessoas podem ser ineficazes ou tóxicos a outras (Wolf et al., 2000).

Com relação a pacientes tratados com lítio, já foi relatado que pacientes com TB respondedores têm maior probabilidade de ter familiares com TB também respondedores ao tratamento com lítio (Mendlewicz et al., 1973; Grof et al., 2002). Por outro lado, os não respondedores (refratários) são mais propensos a apresentar início precoce dos sintomas do TB, muitas vezes na infância (Strober et al., 1988), e seus familiares apresentarem maior incidência de esquizofrenia (Grof et al., 1994). Esses achados sugerem que a resposta terapêutica ao lítio entre os indivíduos com TB parece ser influenciada por características genéticas (Smeraldi et al., 1984; Smoller, 2003; Alda et al., 2005; Grof, 2010; McCarthy et al., 2010).

A refratariedade ao lítio no TB é difícil de ser definida devido à complexidade da doença com ciclos imprevisíveis de sintomas clínicos (Fountoulakis, 2011). O início da resposta pode demorar de 10 a 12 semanas, até que concentrações de lítio atinjam os níveis terapêuticos no plasma. Antes disso, o paciente não pode ser considerado refratário. Alguns autores sugerem que, para que o lítio tenha seu efeito terapêutico, é necessário que o paciente em mania aguda espere pelo menos de 3 a 4 semanas e apresente concentrações plasmáticas de 0,6 mmol/L até no máximo 1,2 mmol/L. Em ciclos de depressão o paciente deverá apresentar concentrações plasmáticas

de 0,4 mmol/L a 0,8mmol/L. Se neste período de tempo e nestas concentrações não houver resposta, pode significar um caso de refratariedade (Fountoulakis, 2011).

Diferentes escalas de avaliação auxiliam na definição da refratariedade no TB, sendo que, em casos de mania, pontuações para escalas desenvolvidas para avaliação de depressão como: HDRS (*Hamilton Depression Rating Scale*) e MADRS (*Montgomery-Asberg Depression Scale*) não deverão sofrer mudanças significativas e, para escala YMRS (*Young Mania Rating Scale*) desenvolvida para avaliação de mania no TB e escala MRS (*Modified Rankin Scale*) desenvolvida para medir o grau de incapacidade de pessoas que sofreram algum tipo de comprometimento neurológico (Hamilton, 1960; Montgomery; Asberg, 1979; Young et al., 1978, Rankin, 1957), terá que ser maior que 6 em período de 8 a 10 semanas. Em casos de depressão bipolar aguda, não deverá haver mudanças significativas de acordo com YMRS e MRS. Para as escalas MADRS e HDRS, há necessidade da pontuação ser maior que 5 em período de 10 a 12 semanas. Com base em HDRS e MADRS, YMRS e MRS, as pontuações deverão ser maior que 7 entre os episódios de mania e depressão em período de um ano para constatação de refratariedade (Fountoulakis, 2011).

Em estudo de Keidienst et al. (2005), os autores descreveram 42 potenciais fatores relacionados a resposta terapêutica ao lítio, entre eles: número de episódios prévios do humor, número de episódios maníacos prévios, número de episódios depressivos prévios, número de hospitalizações prévias, frequência dos episódios e ciclagens rápidas, duração do intervalo entre o primeiro e o segundo episódio, duração total do transtorno, idade de início dos sintomas, padrão do intervalo entre mania e depressão, entre outros fatores. Este trabalho apontou que o intervalo de mania e depressão e baixo número de hospitalizações prévias estavam claramente relacionados à resposta terapêutica ao lítio.

1.2.1 Escala ALDA

Como visto, um dos maiores desafios encontrado no tratamento do TB é definir o fenótipo de resposta ao lítio para uma terapia eficaz capaz de reduzir a frequência dos sintomas e possíveis recaídas. Foi tomando este ponto de partida que Martin Alda e *ConLiGen*, consórcio internacional que visa facilitar a análise dos dados de alta qualidade relacionados à resposta ao tratamento de lítio, desenvolveram a escala ALDA (anexo 1). Esta escala utiliza-se de uma abordagem analítica longitudinal onde são analisados o tempo de recorrência ou a quantidade de sintomas apresentados durante o curso do tratamento (Grof et al., 2002).

A escala é constituída por dois critérios, denominados “A” e “B”. A pontuação “A” da escala é uma medida generalizada da gravidade dos sintomas ou melhora apresentada durante todo o tratamento em com lítio. Pelas pontuações da escala “B” (B1 – B5), o fenótipo apresentado em “A” é ponderado levando-se em consideração o grau em que a alteração clínica observada pelo paciente está relacionada ao lítio. Com a escala respondida, as pontuações obtidas em “B” serão subtraídas de “A”. Pontuações maiores que 7 serão caracterizados com fenótipo “respondedor” e, pontuações menores que 7 com fenótipo “refratário” (Schulze et al., 2010).

1.3 Farmacogenética

A farmacogenética originou-se há mais de 50 anos quando o geneticista Arno Motulsky, em 1957, publicou um artigo sobre evidências da hereditariedade das reações adversas à droga antimalárica primaquina, e argumentou dizendo que estariam ligadas a *déficits* nas atividades de enzimas específicas envolvidas no funcionamento da droga. Dois anos depois Vogel, na Alemanha, cunhou o termo “farmacogenética” (Ozdemir et al., 2012)

O princípio da farmacogenética é estudar variações genéticas que possam influenciar na eficácia do medicamento, comprometimento da resposta medicamentosa e causar toxicidade (Mroziwicz e Tyndale, 2010).

As variações genéticas são frequentemente encontradas em sequências de nucleotídeos do DNA. Ou seja, apesar do DNA de cada indivíduo ser 99,9% idêntico, a quantidade de nucleotídeos de cada par de genes herdados de cada genitor, é muito grande – aproximadamente três bilhões – aumentando a margem de erro para variações nas sequências de nucleotídeos. Variações encontradas em mais de 1% da população são chamadas “polimorfismos” (Kruglyak e Nickerson, 2001).

Um tipo de variação genética bem definida e bastante associada à resposta terapêutica são os polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* - *SNPs*) que são alterações ocorridas no DNA onde uma base nitrogenada é substituída por outra qualquer (A/T, A/G, A/C, G/C, G/T). (Pennisi, 1998). Estes *SNPs* podem ser considerados como marcadores moleculares de predisposição do indivíduo a certos tipos de doenças, alvos terapêuticos no desenvolvimento de novas drogas ou ainda como marcadores de interferências no metabolismo e resposta às drogas (Figura 2).

FONTE: <http://genetics.thetech.org/ask-a-geneticist/how-gwas-works>

Figura 2 – Single Nucleotide Polymorphism – SNPs. *SNP* inserido em uma das fitas de DNA havendo substituição de um alelo por outro. A atividade da proteína expressa por este gene contendo a variação pode ser alterada.

Desta maneira, para esse estudo, selecionamos polimorfismos em genes envolvidos com o mecanismo de ação do lítio, como: neuroproteção (*GSK3 β* - glicogênio sintase quinase 3 β ; *BDNF* - fator neurotrófico derivado do cérebro e *NTRK2* - receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo 2) e genes que codificam enzimas envolvidas em atividades de segundos mensageiros (*CREB* - proteína ligada ao elemento de resposta cAMP)) (Lin et al., 2013).

1.3.1 GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 beta*)

O gene *GSK3 β* é responsável por codificar a proteína GSK3 β , que atua no metabolismo energético e desenvolvimento de células neuronais. O lítio inibe a proteína GSK3 β de mamíferos pela competição com íons de magnésio aumentando a fosforilação desta substância e, conseqüentemente, a inativando (Lin et al., 2013). O gene de *GSK3 β* contém o polimorfismo rs334558 (-50C/T) situado no cromossomo 3, posição 13.33, exon 13, região promotora, relacionada ao início da transcrição gênica (Lee e Kim, 2011). Em estudo de Benedetti et al. (2004), este polimorfismo foi descrito por interferir no mecanismo transcricional, no qual o alelo T possui uma atividade elevada conferindo aumento da transcrição do gene *GSK3 β* , e de estar presente com maior frequência em pacientes com TB mais jovens, além disso, no mesmo estudo, o genótipo TT deste polimorfismo foi relacionado à resposta ineficaz ao tratamento com lítio quando comparados aos genótipos heterozigoto TC e homozigoto CC. Estes relatos também foram encontrados em estudo de Lin et al. (2013) no qual o genótipo TT foi relacionado à resposta insuficiente ao tratamento com lítio

1.3.2 BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*)

Em humanos, o gene *BDNF* está situado no cromossomo 11 posição 14.1 (Sears et al., 2011). O polimorfismo mais relatado é o rs6265 (Val66Met), havendo substituição de guanina por adenosina no nucleotídeo 196, resultando em troca do aminoácido valina por metionina na proteína traduzida, relacionado à ausência de resposta ao tratamento com lítio. Este polimorfismo foi inicialmente descrito em pacientes chineses diagnosticados com TB tratados com lítio (Wang et al., 2012).

Testes em animais comprovam a interação entre os diferentes alelos do gene *BDNF* com estabilizadores de humor, entre eles o lítio, alguns antidepressivos e anticonvulsivantes (como o valproato), terapia eletroconvulsiva e estimulação magnética transcraniana repetitiva (Matsuo et

al., 2009). O efeito destes tratamentos pode influenciar na expressão do gene *BDNF* ou diretamente na proteína BDNF na região do hipocampo e lobo frontal (Matsuo et al., 2009).

1.3.3 NTRK2 (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2*)

A proteína NTRK2 é produzida pelo gene *NTRK2*, que possui 24 éxons e está localizado na posição 9q22.1. O polimorfismo de maior incidência já descrito é o rs1387923 (T/C). O alelo T foi associado a uma melhor resposta ao tratamento com lítio (Salloum et al., 2014).

A NTRK2 tem papel de receptor importante na transdução de sinal para a neurotrofina BDNF e na modulação da diferenciação neural e sobrevivência em regiões do córtex pré-frontal (Salloum et al., 2014). Há evidências de que o lítio ativa o receptor NTRK2 *in vivo* e induz cascatas de sinalização para a autofosforilação do receptor NTRK2 em culturas celulares de hipocampo e córtex frontal de roedores (Rantamaki et al., 2006).

1.3.4 CREB (*cAMP response element-binding protein*)

Lítio é responsável por inibir GSK3 β o qual é responsável pela regulação da atividade de CREB. A inativação de GSK3 β acarreta no aumento da atividade de CREB, possibilitando o aumento da transcrição de proteínas citoprotetoras e neurotrofinas como Bcl-2 e BDNF (Kapczinski et al., 2008). Estudo de Alda et al (2013) também apontam que a fosforilação e a atividade transcricional de CREB é modulada pelo lítio. Existem evidências de que o envolvimento dos polimorfismos *CREB1-1H* (G/A) e *CREB1-7H* (C/T) situados no gene *CREB1*, 2q33.3, exon 14, especificamente os genótipos GA (*CREB1-1H*) e o genótipo TT (*CREB1-7H*) relacionados à resposta ineficaz ao lítio (Mamdani et al., 2013).

2 OBJETIVOS

i) Avaliar polimorfismos de DNA nos genes: *GSK3 β* , *CREB*, *BDNF* e *NTRK2* em pacientes diagnosticados com transtorno bipolar, respondedores e refratários ao tratamento com lítio.

ii) Identificar potenciais polimorfismos marcadores de refratariedade ao tratamento com lítio.

iii) Analisar a aplicabilidade da escala ALDA para determinação de refratariedade ao lítio na sub-amostra em estudo

3 DESENHO

Estudo transversal e retrospectivo em dois grupos de pacientes com transtorno bipolar: a) respondedores ao lítio; e b) refratários ao lítio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram recrutados 178 indivíduos com TB em tratamento com lítio (Figura 3), sendo 51 do sexo masculino e 127 do sexo feminino (entre 50 e 65 anos).

Figura 3 – Processo de recrutamento dos pacientes com TB em tratamento com lítio. Dentre todos os pacientes do Instituto de Psiquiatria – HCFMUSP que fazem tratamento com lítio foram selecionados apenas aqueles com transtorno bipolar. Destes, foram recrutados pacientes para coleta de sangue de grupos de pesquisa como: GRUDA (ambulatório de transtornos afetivos) e ambulatório do LIM-27 (laboratório de neurociências).

Destes 178 pacientes recrutados, foram recontactados 56 pacientes, nos quais foi aplicada a Escala ALDA.

Foram excluídos aqueles pacientes com comorbidades neuropsiquiátricas.

4.2 Preparo de amostra

O DNA foi obtido a partir de 5-10 ml do sangue periférico total em tubo de coleta EDTA e extraídos por método salino (*salting out*) desenvolvido por Miller et al. (1988) que consiste na salinização das proteínas celulares por desidratação e precipitação com uma solução de NaCl saturada permitindo a separação do DNA pelo aumento da força iônica da fase aquosa o qual acarreta na diminuição da sua solubilidade. Os ácidos nucleicos extraídos foram analisados e quantificados em espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000* (para que o DNA estivesse em condições aceitáveis, a razão de absorbância de 260/280 nm deveria ser ~ 1,8 e para razão 260/230 nm a razão deveria ser ~ 2,0) (Desjardins e Conklin, 2010).

Os polimorfismos de DNA foram avaliados por discriminação alélica por meio de ensaios de genotipagem de *SNPs* previamente fabricados utilizando o sistema *TaqMan®* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), no equipamento de PCR em tempo real.

4.3 Análises das amostras - PCR em tempo real - sistema *TaqMan®*

PCR em tempo real tem por finalidade analisar quantitativamente ácidos nucleicos em tempo real (Kubista et al., 2006). PCR (*Polymerase Chain Reaction*- Reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real necessita de um termociclador com capacidade para capturar fluorescência e transmitir a um computador com *software* adequado para análise final da reação. Quanto maior for a emissão da fluorescência maior será o número de fragmentos gerados de produtos da PCR (Valones et al., 2009).

Inicialmente a técnica segue os mesmos princípios de uma reação de PCR convencional, ou seja, faz uso de soluções contendo Taq DNA polimerase (enzima bacteriana com capacidade de suportar altas temperaturas) com atividade 5' exonuclease 3', oligonucleotídeos e iniciadores e terminadores (*primers*) complementares ao alvo da sequência de DNA que deseja analisar. O processo ocorre em três etapas: desnaturação, anelamento e elongação.

Estes passos consistem na separação da fita dupla de DNA por meio de altas temperaturas, em seguida, com o resfriamento da solução, os *primers* anelam-se a sequência alvo de DNA. O Taq DNA polimerase será responsável pela detecção da sequência e pela elongação por oligonucleotídeos criando uma cópia complementar a sequência de DNA alvo (Kariyazono et al., 2001).

O PCR em tempo real com sistema *TaqMan*® consiste na utilização de sondas acopladas a Taq DNA polimerase (sondas *TaqMan*) (Figura 4). Esta sonda contém a fluorescência “repórter” em sua extremidade 5’, e a fluorescência “*quencher*” na extremidade 3’. Enquanto a sonda está intacta, não há emissão de fluorescência pelo “repórter” (Arya et al., 2005). Quando a sonda detecta a sequência alvo e anela-se, ao final da elongação ela é clivada pela enzima Taq polimerase com atividade de exonuclease, transferindo energia ressonante de fluorescência *FRET* para o repórter que será absorvida pelo *quencher* (Lee et al., 1993). A clivagem da sonda pela Taq polimerase separa os fluorófilos repórter e *quencher*, aumentando a emissão de fluorescência a qual será detectada em tempo real pelo *software*, onde será possível identificar e quantificar a sequência alvo de DNA de interesse que será proporcional à quantidade de fragmentos amplificados pelo processo da PCR (Heid et al., 1996).

Fonte: Adaptado de Shaad et al., 2003.

Figura 4 – PCR em tempo real – sistema TaqMan®. PCR em tempo real com sistema *TaqMan*® com sondas acopladas a Taq DNA polimerase (sondas *TaqMan*) contendo fluorescência “repórter” e “quencher” nas extremidades 5’ e 3’ da fita de DNA respectivamente. A emissão de fluorescência “repórter” ocorre com a clivagem da sonda, anexada a sequência alvo, pela enzima Taq DNA polimerase transferindo energia ressonante de fluorescência *FRET* para o “repórter” que será absorvida pelo “quencher”. Esta energia atuará com o intuito de aumentar a emissão da fluorescência pelo “repórter”. Esta fluorescência será então detectada em tempo real pelo *software* onde será possível analisar a sequência alvo de interesse e quantificá-la de acordo com a quantidade de fragmentos amplificados gerados pela reação de PCR.

4.4 Genes e polimorfismos investigados

A seleção dos genes candidatos foi feita de acordo com duas abordagens principais: (A) dados da literatura e (B) estar presente em vias metabólicas envolvidas com mecanismos moleculares do lítio e com processos suscetíveis ao transtorno bipolar. Assim, selecionamos polimorfismos dos genes candidatos de acordo com seu papel na farmacodinâmica e a refratariedade ao tratamento com lítio (Tabela 3).

Tabela 1 - Genes e polimorfismos relacionados à farmacodinâmica do lítio

Fármaco	Genes	Polimorfismos	Genótipos	Referências
Lítio	<i>GSK3β</i>	rs334558	C>T	Lin et al., 2013; Kwok et al. 2005
	<i>CREB</i>	CREB1-1H (rs1050641)	G>A	Mamdani et al., 2013;
		CREB1-7H (rs2551919)	C>T	Wang et al. 2013
	<i>BDNF</i>	rs6265	G>A (Val66Met)	Wang et al., 2012; Matsuo et al., 2009
	<i>NTRK2</i>	rs1387923	T>C	Dmitrzak-Weglarz et al., 2008

GSK3β: glycogen synthase kinase 3 beta; *CREB*: cAMP response element-binding protein;
BDNF: brain-derived neurotrophic factor; *NTRK2*: neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2;
 C: Citosina; T: Tirosina; G: Guanina; A: Adenina

4.5 Análises estatísticas

Foram realizados testes *Chi-quadrado de Pearson* e Teste exato de Fisher, para as comparações genéticas de controle de casos, as diferenças no genótipo e na distribuição de alelos entre respondedores e refratários, *Teste – T* para análise dos resultados entre os dois grupos, refratários e respondedores, *Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)*, usado para verificar o equilíbrio nas distribuições genotípicas entre pacientes respondedores e refratários com TB, e *V de Cramér* para análise de associação entre duas variáveis. Análise realizada por meio do programa estatístico *Statistical package for Social Science (SPSS)* versão 14, para *Windows* e *Excel* do *Microsoft Office*. A significância estatística para todas as análises foi estabelecida para valores de $p < 0,05$ ($\alpha = 95\%$).

5 RESULTADOS

Dos 178 pacientes recrutados, definimos, pelos critérios estabelecidos, 143 respondedores e 35 refratários (Tabela 1). Foram incluídos pacientes com TB avaliados pela aplicação da HDRS e YMRS e pela análise do prontuário dos pacientes.

Tabela 2 – Dados sócio-demográficos da casuística estudada com aplicação das escalas HDRS e YMRS

Amostra total		Respondedor (n=143)	Refratário (n=35)	p
Gênero (M/F)		40/103	11/24	0,4
Idade (média $\pm$ dp)		53 $\pm$ 17	52 $\pm$ 16	0,73
Escolaridade (média $\pm$ dp)		10,4 $\pm$ 2,68	10,8 $\pm$ 3	0,5
Etnia	Branco	129 (90,1%)	32 (91,4%)	0,8
	Mulato	11 (7,8%)	2 (5,7%)	
	Negro	3 (2,1%)	1 (2,9%)	

M: Masculino; F: Feminino; dp: desvio padrão

Com base nas escalas HDRS e MADRS, YMRS e MRS, os pacientes teriam que ter uma pontuação maior que 7 entre os episódios de mania e depressão em período de um ano para constatação de refratariedade.

Dos 178 pacientes recrutados, foi possível recontactar 56 pacientes, nos quais foi aplicada a Escala ALDA resultando em 12 pacientes classificados como respondedores e 44 como refratários (tabela 2). De acordo com a escala ALDA, os pacientes refratários teriam que apresentar pontuação final inferior à 7.

Foram excluídos aqueles com comorbidades neuropsiquiátricas.

Para melhor compreensão, denominamos pacientes classificados pela metodologia de escalas HDRS e YMRS principalmente, e prontuários por: “Amostra total”, e pacientes classificados pela escala ALDA por: “Sub-amostra ALDA”.

Tabela 3– Dados sócio-demográficos da casuística estudada com aplicação da escala ALDA

<u>Subamostra Alda</u>	Respondedor (n=12)	Refratário (n=44)	<i>p</i>
Gênero (M/F)	2/10	15/29	0,2
Idade (media $\pm$ dp)	52 $\pm$ 14	46 $\pm$ 15	0,21
Escolaridade (media $\pm$ dp)	10 $\pm$ 2,5	11,5 $\pm$ 2,8	0,1
Etnia	Branco	41 (95,3%)	<0,02
	Mulato	1 (2,3%)	
	Negro	1 (2,3%)	

M: Masculino; F: Feminino; dp: desvio padrão

5.1 Padronização

Para a padronização do método de identificação dos polimorfismos dos genes *GSK3 β* , *BDNF*, *NTRK2* e *CREB* foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis, seguindo o mesmo protocolo de preparo de amostras, um com adição de betaína (proteína com ação otimizada para amplificação

do DNA na PCR) (figuras 5A, 6A e 7A) e outro sem betaína (figuras 5B, 6B e 7B) As reações foram realizadas com sondas repórter VIC (para alelos normais) e FAM (para alelos polimórficos), além da utilização da sonda quencher MGB com alta especificidade. Ao final optou-se pela reação sem betaína que apresentou melhor desempenho de tempo com início da amplificação do baseline no ciclo 3 e linear de detecção de fluorescência na fase exponencial (threshold) entre 22 e 25 ciclos, além da alta quantidade de sequências-alvo amplificadas pela metodologia de PCR em tempo real.

Figura 5 – Amplificação de fragmentos heterozigotos em PCR em tempo real. A) Com adição de betaína. Baixa quantidade de fragmentos amplificados representados como heterozigoto no gráfico pelas fluorescências em verde (VIC) e em vermelho (FAM); B) Sem adição de betaína. Alta quantidade de fragmentos amplificados representados como heterozigoto no gráfico pelas fluorescências em verde (VIC) e em vermelho (FAM).

Figura 6 – Amplificação de fragmentos homozigotos em PCR em tempo real. A) Com adição de betaína. Alta quantidade de fragmentos amplificados representados como homozigoto no gráfico pela fluorescência em vermelho (FAM) em maior espaço de tempo; B) Sem adição de betaína. Alta quantidade de fragmentos amplificados representados como homozigoto no gráfico pela fluorescência em vermelho (FAM) em menor espaço de tempo.

Figura 7 – Amplificação de fragmentos homozigotos em PCR em tempo real. A) Com adição de betaína. Alta quantidade de fragmentos amplificados representados como homozigoto no gráfico pela fluorescência em verde (VIC) em maior espaço de tempo; B) Sem adição de betaína. Alta quantidade de fragmentos amplificados representados como homozigoto no gráfico pela fluorescência em verde (VIC) em menor espaço de tempo.

5.2 Análise das amostras totais e subamostra ALDA

5.2.1 *GSK3β* (rs334558)

Foram analisados os polimorfismos selecionados de 178 indivíduos da amostra total, sendo 35 refratários e 143 respondedores e 56 indivíduos da subamostra Alda, destes, 44 refratários e 12 respondedores.

Ao comparar os resultados obtidos relacionados ao polimorfismo do gene *GSK3β* em pacientes da amostra total, observamos que indivíduos respondedores apresentaram maior incidência de genótipo heterozigoto CT enquanto que refratários apresentaram a incidência maior para genótipo homozigoto polimórfico TT comparado aos respondedores ($p=0,0480$). Para frequência alélica, pacientes respondedores apresentaram maior número de alelos C normal e pacientes refratários, maior incidência do alelo T polimórfico.

Pacientes da subamostra ALDA, tanto refratários quanto respondedores não apresentaram quaisquer diferenças genotípicas e alélicas conclusivas. Esses resultados quando comparamos aos resultados da amostra total, foram opostos (Figura 8).

A) **Amostra total**
Frequência genotípica *GSK3β*

*** $p=0,0480$**

<i>GSK3β</i> (C>T)		Refratário	Respondedor	X^2 (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	TT	10 (31,2)	20 (14,4)	$p = 0,0480$
Genótipo	CC	11 (34,3)	44 (31,8)	
	CT	11 (34,3)	74 (53,6)	

B) **Subamostra ALDA**
Frequência genotípica *GSK3β*

<i>GSK3β</i> (C>T)		Refratário	Respondedor	X^2 (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	TT	5 (11,6)	2 (18,1)	$p = 0,8392$
Genótipo	CC	18 (41,8)	4 (36,6)	
	CT	20 (46,5)	5 (45,4)

<i>GSK3β</i> (C>T)		Refratário Amostra total	Respondedor Amostra total	Refratário Subamostra ALDA	Respondedor Subamostra ALDA	HWE
		N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	
Alelo	C	33 (51,6)	162 (58,7)	56 (65,1)	13 (59,1)	p = 0,8756
	T	31 (48,4)	114 (41,3)	30 (34,9)	9 (40,9)	

Figura 8 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado de *GSK3β*. A) Frequência genotípica da amostra total; B) Frequência genotípica da subamostra ALDA; C) Frequência alélica da amostra total; D) Frequência alélica da subamostra ALDA. Os resultados referentes a subamostra ALDA não apresentaram conclusões e disparidade entre resultados comparados às análises da amostra total. Análise Qui-quadrado de Pearson e *Hardy-Weinberg Equilibrium* (HWE) ($p=0,0480$; $p=0,839$, $p=0,875$).

5.2.2 *CREB1-1H* (rs1050641)

Já com relação ao polimorfismo *CREB1-1H*, não foi possível coletar dados a respeito do genótipo e frequência alélica em ambas as metodologias em razão das amostras se mostrarem 100% homozigotas GG (genótipo não polimórfico) e frequência alélica G nos dois grupos, refratários e respondedores, excluindo-se a possibilidade de alterações polimórficas nesta população de pacientes com TB.

5.2.3 *CREB1-7H* (rs2551919)

Para o polimorfismo *CREB1-7H*, não encontramos diferenças genotípicas ou alélicas significativas entre refratários e respondedores nos dois grupos. Entretanto notamos que na amostra total, pacientes refratários apresentaram maior índice do genótipo heretozigoto CT, e pacientes respondedores uma maior porcentagem do genótipo normal CC. Para frequência alélica, pacientes respondedores apresentaram maior índice de alelo polimórfico T comparado a pacientes respondedores. Com relação à subamostra ALDA, os resultados mostraram-se opostos aos da amostra total, nos chamando atenção apenas pela maior frequência do genótipo polimórfico TT em pacientes refrários comparado a respondedores (Figura 9).

<i>CREB1-7H</i> (C>T)		Refratário	Respondedor	χ^2 (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	CC	21 (61,7)	101 (71,6)	p = 0,4993
Genótipo	CT	12 (35,2)	36 (25,5)	
	TT	1 (2,94)	4 (2,84)	

B) **Subamostra ALDA**
Frequência genotípica *CREB1-7H*

<i>CREB1-7H</i> (C>T)		Refratário	Respondedor	χ^2 (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	CC	33 (75)	7 (53,8)	p = 0,4298
Genótipo	CT	10 (22,7)	5 (41,6)	
	TT	1 (2,27)	0 (0)	

C) **Amostra total**
Frequência alélica *CREB1-7H*

Figura 9 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado de *CREB1-7H*. A) Frequência genotípica da amostra total; B) Frequência genotípica da subamostra ALDA; C) Frequência alélica da amostra total; D) Frequência alélica da subamostra ALDA. Os resultados da análise genotípica nos mostraram maior incidência do genótipo heterozigoto CT em pacientes da amostra total refratários comparados aos respondedores, estes com maior incidência do genótipo homozigoto CC, maior incidência do alelo polimórfico T em pacientes refratários, corroborando ao esperado. As análises obtidas para a subamostra ALDA não mostraram nenhuma semelhança de resultados quando comparados a amostra total. Nenhuma das análises apresentou significância estatística. Análise de Fisher e *Hardy-Weinberg Equilibrium* (HWE) ($p=0,4993$; $p=0,4928$, $p=1$).

5.2.4 *BDNF* (rs6265)

Na análise dos resultados para o polimorfismo do gene *BDNF*, também não encontramos diferenças estatísticas significativas. Todavia o genótipo foi encontrado com maior incidência nos respondedores da amostra total já na subamostra ALDA o genótipo polimórfico AA apresentou-se aumentado nos refratários (Figura 10).

A) **Amostra total**
Frequência genotípica *BDNF*

<i>BDNF</i> (G>A)		Refratário	Respondedor	χ^2 (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	GG	24 (70,5)	94 (66,6)	p = 0,1798
Genótipo	GA	8 (23,5)	45 (31,9)	
	AA	2 (5,8)	2 (1,42)	

B) **Subamostra ALDA**
Frequência genotípica *BDNF*

<i>BDNF</i> (G>A)		Refratário	Respondedor	χ^2 (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	GG	28 (63,6)	9 (75)	p = 0,3032
Genótipo	GA	15 (34)	2 (16,6)	
	AA	1 (2,27)	1 (8,3)	

C) **Amostra total**
Frequência alélica *BDNF*

D) **Subamostra ALDA**
Frequência alélica *BDNF*

<i>BDNF</i> (G>A)		Refratário Amostra total	Respondedor Amostra total	Refratário Subamostra ALDA	Respondedor Subamostra ALDA	HWE
		N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	
Alelo	G	56 (82,4)	233 (82,6)	71 (80,7)	20 (83,3)	p = 0,607
	A	12 (17,6)	49 (17,4)	17 (19,3)	4 (16,7)	

Figura 10 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado do gene *BDNF*. A) Frequência genotípica da amostra total; B) Frequência genotípica da subamostra ALDA; C) Frequência alélica da amostra total; D) Frequência alélica da subamostra ALDA. Os resultados obtidos nas análises das frequências genotípicas e alélicas não apresentaram diferenças significativas entre ambos os grupos (refratários e respondedores) para a amostra total e subamostra ALDA. Análise de Fisher e Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ($p=0,1798$; $p=0,3032$; $p=0,607$).

5.2.5 *NTRK2* (rs1387923)

As análises do polimorfismo do gene *NTRK2* não apresentaram resultados significativos entre os grupos respondedores e refratários e similaridade de resultados na amostra total e subamostra ALDA.

Apesar da significância estatística para a análise da frequência alélica na subamostra ALDA, não há equilíbrio com os resultados da frequência genotípica da subamostra ALDA obtidos por conta das amostras, em sua maioria, mostrarem-se heterozigotas CT em ambos os grupos respondedores e refratários, não polimórfico CC (Figura 11).

A) **Amostra total**
Frequência genotípica *NTRK2*

<i>NTRK2</i> (T>C)		Refratário	Respondedor	X ² (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	CC	6 (17,6)	24 (17)	p = 0,7882
Genótipo	CT	18 (52,9)	83 (58,8)	
	TT	10 (29,4)	34 (24,1)	

B) **Subamostra ALDA**
Frequência genotípica *NTRK2*

<i>NTRK2</i> (T>C)		Refratário	Respondedor	X ² (Refr. vs. Resp.)
		N (%)	N (%)	
	CC	6 (13,6)	1 (8,3)	p = 0,5126
Genótipo	CT	30 (68,1)	7 (58,3)	
	TT	8 (18,1)	4 (33,3)

<i>NTRK2</i> (T>C)		Refratário Amostra total	Respondedor Amostra total	Refratário Subamostra ALDA	Respondedor Subamostra ALDA	HWE
		N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	
Alelo	C	38 (55,9)	151(53,5)	46 (52,3)	15 (62,5)	p = 0,0473
	T	30 (44,1)	131 (46,5)	42 (47,7)	9 (37,5)	

Figura 11 – Incidência de genótipo em grupos refratários e respondedores em relação ao polimorfismo analisado de *NTRK2*. A) Frequência genotípica da amostra total; B) Frequência genotípica da subamostra ALDA; C) Frequência alélica da amostra total; D) Frequência alélica da subamostra ALDA. Os resultados obtidos nas análises de frequência genotípica e alélica em ambas as amostras (total e subamostra ALDA) não foram substanciais. Análise Qui-Quadrado de Pearone *Hardy-Weinberg Equilibrium* (HWE) ($p=0,7882$; $p=0,5126$, **$p=0,0473$**).

6 *Análise de associação entre os polimorfismos*

A análise de associação entre os polimorfismos investigados com a utilização da ferramenta estatística V de Cramér não demonstrou associação visto que, para que haja associação é necessário que os resultados devam ser o mais próximo de 1, o que não ocorreu com os polimorfismos investigados neste estudo.

Tabela 4 – Análise de associação entre os polimorfismos investigados

<i>SNPs</i> associados	V
<i>GSK3β + CREB1-7H</i>	0,103
<i>GSK3β + BDNF</i>	0,091
<i>GSK3β +NTRK2</i>	0,114
<i>CREB1-7H +BDNF</i>	0,064
<i>CREB1-7H + NTRK2</i>	0,074
<i>BDNF + NTRK2</i>	0,080

7 DISCUSSÃO

Neste estudo propusemos identificar polimorfismos genéticos preditores de resposta ao tratamento com lítio que possam ser utilizados como biomarcadores. Para isso, analisamos os polimorfismos de quatro genes com envolvimento na resposta ao lítio e seu possível mecanismo de ação: *GSK3 β* , *CREB*, *BDNF* e *NTRK2*. Na nossa amostra, os polimorfismos dos genes *CREB1-1H* (rs1050641), *CREB1-7H* (rs2551919), *BDNF* (rs6265) e *NTRK2* (rs1387923) não apresentam associação significativa dos genótipos com a resposta à terapia com lítio. Nossos resultados relacionados ao polimorfismo *CREB1-1H* (rs1050641) mostraram-se 100% homozigotos GG, genótipo não polimórfico, em todas as amostras. Este resultado não corrobora estudo prévio, no qual Mamdani et al. (2008) encontraram o polimorfismo G/A no gene *CREB1-H* (rs1050641) como possível marcador de refratariedade ao lítio.

O *CREB1-7H* compõe a família de genes responsáveis pela transcrição da proteína CREB importante por sua função na regulação da transcrição de neutrofinas, fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (Wang et al. 2013). O polimorfismo C/T (rs2551919) do gene *CREB1-7H* se manifestou, em nossas amostras, com maior incidência do genótipo heterozigoto CT e com maior expressão do alelo polimórfico T em pacientes refratários. Nossos achados relacionados a este polimorfismo, embora sem significância, corroboram achados da literatura, como em estudo desenvolvido com pacientes diagnosticados com TB, no qual foi demonstrada a relação do genótipo polimórfico TT do gene *CREB1-7H* (rs2551919) e a refratariedade ao lítio Mamdani et al., 2008.

Com relação ao polimorfismo *Val66Met* G/A (rs6265) do gene *BDNF* nossos resultados, apesar de discretos, apresentaram maior incidência do genótipo polimórfico AA em pacientes refratários ao tratamento com lítio. De acordo com estudos de Dmitrzak-Weglaz et al. (2008) e Matsuo et al. (2009), o polimorfismo *Val66Met* (genótipo AA) é mais incidente entre os refratários e está relacionado ao prejuízo na resposta medicamentosa. O alelo *Met* de *BDNF* está relacionado a uma melhor resposta ao tratamento com lítio (Matsuo

et al., 2009). Esta associação supostamente se dá por conta dos mecanismos compensatórios do lítio em aumentar os níveis de BDNF que se encontram reduzidos em pacientes com TB devido à descompensação de proteínas como CREB e GSK3 β , prejudicando a transcrição de BDNF (de Cid Ret al., 2008; Rybawoski et al., 2007). Acredita-se que são estas vias as responsáveis pela atividade neuroprotetora do lítio e reestabelecimento da função cerebral (Tseng et al., 2008). Este mecanismo desregulado corrobora a teoria do efeito neurotóxico em pacientes refratários ao tratamento sendo a causa dos piores prognósticos (Rybawosky et al., 2007).

Com relação ao gene *NTRK2* não observamos diferença que comprovasse a relação do alelo polimórfico C do polimorfismo analisado rs1387923 (T/C) com a refratariedade, já que os grupos (respondedores e refratários) apresentaram frequência genotípica similar. Este achado diverge do estudo de Dmित्रzak-Weglarz et al. (2008) no qual foi possível constatar a relação do polimorfismo C com a resposta insuficiente ao lítio em pacientes bipolares.

GSK3 β é um elemento da via Wnt/ β -catenina envolvido no controle da expressão gênica, sobrevivência e adesão celular. Esta quinase tem por finalidade, além da modulação da homeostase glicolítica, regular a plasticidade neuronal, neurodesenvolvimento e sobrevivência celular. Sua desregulação está envolvida em comorbidades psiquiátricas e doenças neurodegenerativas (Benetti et al. 2004). Em nosso estudo, os resultados obtidos na análise genotípica correspondente ao polimorfismo rs334558 (C/T) do gene *GSK3 β* , verificamos maior incidência do genótipo heterozigoto CT em pacientes respondedores e um aumento do genótipo polimórfico homozigoto TT em pacientes refratários. O polimorfismo rs334558 está localizado na região promotora do gene *GSK3 β* e o genótipo TT já foi descrito como responsável pelo aumento da transcrição deste gene *in vitro* (Kwok et al. 2005). Em estudos de Benetti et al. (2004a, 2004b, 2005) com pacientes bipolares tipo I, foram reportadas evidências da associação deste polimorfismo com a resposta ao lítio sugerindo que, pacientes com genótipo polimórfico TT não apresentam resposta ou apresentam resposta insuficiente ao lítio, diferente de pacientes

com genótipos TC e CC. Além disso, o alelo polimórfico T foi relacionado a pacientes que tiveram o desenvolvimento precoce da doença, de acordo com o *Estudo da Área de Captação Epidemiológica do Instituto Nacional de Saúde Mental (Epidemiological Catchment Area - ECA)*, sendo a idade de início para o transtorno bipolar I 18 anos e para bipolar II, 22 anos (Lima et al, 2005). Esta associação do polimorfismo TT também foi observada em um estudo mais recente de Lin et al. (2013) desenvolvido com pacientes taiwaneses diagnosticados com transtorno bipolar I, confirmando que o genótipo TT do polimorfismo rs334558 leva a uma resposta insuficiente ao tratamento com lítio.

Em pacientes com transtorno bipolar, a proteína GSK3 β encontra-se desregulada e super expressa. O lítio é um íon que possui ação inibitória da GSK3 β de modo direto e indireto. A GSK3 β , por sua vez, confere atividade a outras moléculas quando está inativada: BDNF, NTRK2 e CREB. Baseado nesse mecanismo, propusemos neste estudo avaliar se a refratariedade ao lítio de pacientes com transtorno bipolar correlaciona-se com polimorfismos nos genes que expressam essas moléculas. Encontramos correlação entre o fenótipo refratário com polimorfismo de GSK3 β , mas não para os demais alvos avaliados. Essa diferença poderia ser explicada pelo mecanismo com que o lítio atua: o lítio tem ação direta em GSK3 β , o que não acontece com BDNF, NTRK2 e CREB. Deste modo, polimorfismos nestes alvos podem não ser suficientes para modificar a resposta ao lítio.

Quando realizada a análise de associação utilizando a ferramenta estatística V de Cramér, observamos baixa relação entre os polimorfismos investigados visto que o valor obtido na avaliação foram menores que 1. De acordo com V de Cramér, valores mais próximos de 1 demonstram maior associação.

Para a metodologia ALDA empregada para classificação dos fenótipos na Subamostra ALDA, não obtivemos diferenças que relacionassem os polimorfismos selecionados a refratariedade ao lítio. A escala ALDA se baseia em dados clínicos retrospectivos, divididos em dois critérios: a) análise da melhora clínica do paciente (critério A) e b) análise de fatores de confusão mental e a possível relação entre melhora clínica e tratamento (critério B)

(Manchia et al., 2013; Schulze et al., 2010). A escala Alda foi aplicada em um estudo brasileiro (Lima e Silva et al. 2016) demonstrando êxito na distinção dos grupos de pacientes com transtorno bipolar respondedores e refratários ao tratamento com lítio, no entanto, para que ela seja eficaz, é necessário a aplicação em pacientes preferencialmente em monoterapia com lítio ou utilizando-se de medicações que não interfiram no efeito do lítio em período de pelo menos um ano ou mais próximo do ideal (Grof et al. 2002). Em contrapartida, em nosso estudo a maioria dos pacientes avaliados pela escala ALDA, não aderiram à medicação pelo período esperado e/ou não se encontravam em monoterapia, utilizando também antidepressivos, hipnóticos e antipsicóticos; drogas estas que poderiam interferir na ação do lítio e mascarar seus efeitos terapêuticos.

O consórcio *ConLiGen* realizou anteriormente um estudo de confiabilidade em múltiplos estágios com o objetivo de encontrar a melhor maneira pela qual os valores da escala ALDA podem ser combinados para avaliação da resposta. Avaliaram dois fenótipos principais para resposta ao lítio: um fenótipo dicotômico (resposta ao lítio bom/ ruim), e fenótipo contínuo (faixa de 0 a 10). Foi encontrado o fenótipo dicotômico mais confiável que designou todos os sujeitos com uma pontuação total ≥ 7 como “respondedores”. Para determinação do fenótipo contínuo confiável utilizou-se o escore A, mas excluíram-se todos os sujeitos com um escore B total > 4 (Heilbronner et al, 2016).

Na intenção da separação dos grupos respondedores e refratários, assemelharem-se a metodologia de escalas e prontuários empregada; optamos por fazer uso também do fenótipo contínuo. No entanto, de todos os pacientes refratários determinados pela escala ALDA (53), apenas 5 pacientes converteram para “respondedores”. Este resultado obtido pela aplicação do fenótipo contínuo não foi suficiente para que a metodologia ALDA apresentasse semelhanças estatísticas com os resultados da metodologia de aplicação de escalas e análise dos prontuários.

Apesar de ser cada vez mais utilizada para determinação do fenótipo de resposta ao lítio, a escala ALDA ainda não foi adaptada ou traduzida para seu

uso em português no Brasil, além disso, a aplicação da escala ALDA exige um conhecimento prévio dos critérios do transtorno bipolar, julgamento clínico e análise do curso da doença. O preenchimento da escala requer que seja selecionado o maior período no qual o uso de lítio é bem documentado, e preferencialmente usado em monoterapia (Lima e Silva et al, 2016). É possível que o número reduzido de pacientes avaliados pela escala ALDA neste estudo, tenha comprometido o sucesso no envolvimento desta metodologia para discriminação correta dos grupos respondedores e refratários ao lítio.

A comparação dos nossos achados aos estudos disponíveis na literatura com associação destes polimorfismos é complexa uma vez que os métodos de análise não são os mesmos, assim como o tipo de população (Dmitrzak-Weglarz et al. 2008; Wang et al. 2013). A definição correta do fenótipo e a classificação dos pacientes bipolares é um grande desafio enfrentado não só na clínica, mas especialmente na genética da resposta ao lítio (Mamdani et al., 2008; Serreti e Drago, 2010).

O pequeno número de indivíduos incluídos em nosso estudo pode ter prejudicado a análise da frequência e consequentemente a determinação desses polimorfismos na resposta ao lítio. De acordo com o exposto por Mamdani et al. (2008), o número de amostras analisadas, a alta miscigenação, a epigenética e comorbidades clínicas interferem no baixo envolvimento destes *SNPs* na população. Para a investigação de padrões genéticos alterados, é necessária compreensão total das interferências que podem se tornar preditores de resposta, como: variações do número de cópias (*CNVs*) juntamente com variações de um único nucleotídeo (*SNPs*) e fatores epigenéticos, tal como a metilação (Mamdani et al., 2007). Além disso, deve se considerar que a presença de populações de etnias diferentes na amostra, as quais diferem na composição de seu DNA e nas alterações polimórficas, podem nos levar a falsos positivos na separação dos grupos (respondedores e refratários). Outro problema enfrentado é a escassez de estudos relacionados à associação dos alvos escolhidos neste trabalho, salientando a necessidade da replicação deste estudo com um número maior de participantes e determinação de refratariedade por metodologias previamente estabelecidas e

comprovadas. Além disso, analisamos somente de 1 a 2 polimorfismos por gene, o qual não representa todas as variações genéticas em cada gene estudado.

Apesar de discretos, nossos resultados contribuem para o estudo de marcadores genéticos para a refratariedade ao lítio. Em especial, nossos resultados mostraram-se positivos para análise individual dos polimorfismos do gene *GSK3 β* (rs334558), resultados estes que corroboram aos estudos de Iwahashi et al. (2014); Benedetti et al. (2005); Rybakowski et al. (2012), entre outros importantes estudos. De todos os nossos alvos estudados, apenas um alvo, *CREB1-1H*, se mostrou divergente aos dados previamente publicados na literatura.

8 CONCLUSÕES

- *GSK3 β* (rs334558) mostrou-se um bom biomarcador para refratariedade ao lítio na população estudada, apesar da necessidade de estudos com um maior número amostral.
- Ainda são necessários mais estudos para os demais alvos selecionados (*CREB1-1H* (rs1050641), *CREB1-7H* (rs2551919), *BDNF* (rs6265) e *NTRK2* (rs1387923)) e suas possíveis relações à resposta ao lítio.
- O estudo reforça a necessidade do desenvolvimento de metodologias mais apuradas para determinação de refratariedade ao lítio.

Entendemos que para seguimento e posteriores estudos relacionados a resposta ao lítio, se fazem necessárias ferramentas de bioinformática para análises de enriquecimento, Webgestalt (Figura 12) e String-db (Figura 13), para que possamos avaliar novos alvos de interação entre os genes relacionados ao TB e genes envolvidos à refratariedade ao lítio.

Database:drug Name:lithium ID:DB_ID:PA450243						
C=49; O=10; E=0.03; R=338.52; rawP=7.03e-24; adjP=1.97e-22						
Index	UserID	Value	Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
1	IMPA1	NA	IMPA1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	3612	ENSG00000133731
2	BDNF	NA	BDNF	brain-derived neurotrophic factor	627	ENSG00000176697
3	SLC6A4	NA	SLC6A4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	6532	ENSG00000108576
4	XBP1	NA	XBP1	X-box binding protein 1	7494	ENSG00000100219
5	GSK3B	NA	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	2932	ENSG00000082701
6	CLOCK	NA	CLOCK	clock homolog (mouse)	9575	ENSG00000134852
7	INPP1	NA	INPP1	inositol polyphosphate-1-phosphatase	3628	ENSG00000151689
8	NR1D1	NA	NR1D1	nuclear <u>receptor</u> subfamily 1, group D, member 1	9572	ENSG00000126368
9	IMPA2	NA	IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	3613	ENSG00000141401
10	DRD1	NA	DRD1	dopamine <u>receptor</u> D1	1812	ENSG00000184845

FONTE: Adaptado de

http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/htdocs/final_drug_geneset_file_1440776131.html#lithium

Figura 12 – Análise de enriquecimento TB e lítio. Principais genes de relevância clínica relacionados ao transtorno bipolar e ao lítio.

FONTE: Adaptado de <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=EVi5U5jGt6gB>

Figura 13 – Rede complexa de proteínas envolvidas no TB e lítio. Principais proteínas já descritas envolvidas com o transtorno bipolar e lítio. Os hubs ou “nós” evidenciam maior interação entre uma proteína e outra.

9 ANEXOS

Anexo A. Escala Hamilton (HAM-D)

ESCALA DE HAMILTON
AValiação DA DEPRESSÃO (HAM-D 21 itens)

1	HUMOR DEPRIMIDO 0. Ausente 1. Sentimentos relatados apenas ao ser perguntado 2. Sentimentos relatados espontaneamente, com palavras 3. Comunica os sentimentos com expressão facial, postura, voz e tendência ao choro 4. Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não verbal do paciente	ESCORE
2	SENTIMENTOS DE CULPA 0. Ausentes 1. Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros 2. Idéias de culpa ou ruminação sobre erros passados ou más Ações 3. A doença atual é um castigo. Delírio de culpa 4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras	
3	SUICÍDIO 0. Ausente 1. Sente que a vida não vale a pena 2. Desejaria estar morto; pensa na possibilidade de sua morte 3. Idéias ou gestos suicidas 4. Tentativa de suicídio (qualquer tentativa séria)	
4	INSÔNIA INICIAL 0. Sem dificuldade 1. Tem alguma dificuldade ocasional, isto é, mais de meia hora 2. Queixa de dificuldade para conciliar todas as noites	
5	INSÔNIA INTERMEDIÁRIA 0. Sem dificuldade 1. Queixa-se de inquietude e perturbação durante a noite 2. Acorda à noite; qualquer saída da cama (exceto para urinar)	
6	INSÔNIA TARDIA 0. Sem dificuldade 1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir 2. Incapaz de voltar a conciliar o sono ao deixar a cama	
7	TRABALHOS E ATIVIDADES 0. Sem dificuldade 1. Pensamento/sentimento de incapacidade, fadiga, fraqueza relacionada às atividades; trabalho ou passatempos 2. Perda de interesse por atividades (passatempos, trabalho) – quer diretamente relatada pelo paciente, ou indiretamente, por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa se esforçar para o trabalho ou atividades). 3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda da produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente passa menos de 3h em atividades externas (passatempos ou trabalho hospitalar) 4. Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar de outras atividades além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem auxílio	
8	RETARDO 0. Pensamento e fala normais	

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leve retardo durante a entrevista 2. Retardo óbvio à entrevista 3. Estupor completo 	
9	AGITAÇÃO <ol style="list-style-type: none"> 0. Nenhuma 1. Brinca com as mãos ou com os cabelos, etc 2. Troce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios 	
10	ANSIEDADE PSÍQUICA <ol style="list-style-type: none"> 0. Sem ansiedade 1. Tensão e irritabilidade subjetivas 2. Preocupação com trivialidades 3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou fala 4. Medos expressos sem serem inquiridos 	
11	ANSIEDADE SOMÁTICA (sintomas fisiológicos de ansiedade: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructações; palpitações, cefaléia, hiperventilação, suspiros, sudorese, frequência urinária) <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausente 1. Leve 2. Moderada 3. Grave 4. Incapacitante 	
12	SINTOMAS SOMÁTICOS GASTROINTESTINAIS <ol style="list-style-type: none"> 0. Nenhum 1. Perda do apetite, mas alimenta-se voluntariamente; sensações de peso no abdome 2. Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos 	
13	SINTOMAS SOMÁTICOS EM GERAL <ol style="list-style-type: none"> 0. Nenhum 1. Peso nos membros, costas ou cabeça. Dores nas costas, cefaléia, mialgia. Perda de energia e cansaço 2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2 	
14	SINTOMAS GENITAIS (perda da libido, sintomas menstruais) <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausentes 1. Leves distúrbios menstruais 2. Intensos 	
15	HIPOCONDRIA <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausente 1. Auto-observação aumentada (com relação ao corpo) 2. Preocupação com a saúde 3. Queixas frequentes, pedidos de ajuda, etc 4. Idéias delirantes hipocondríacas 	
16	PERDA DE PESO (Marcar A ou B; A – pela história; B – pela avaliação semanal do psiquiatra responsável) <ol style="list-style-type: none"> A. <ol style="list-style-type: none"> 0. Sem perda de peso 1. Provável perda de peso da doença atual 2. Perda de peso definida B. <ol style="list-style-type: none"> 0. Menos de 0,5kg de perda por semana 1. Mais de 0,5kg de perda por semana 2. Mais de 1kg de perda por semana 	

17	CONSCIÊNCIA DA DOENÇA 0. Reconhece que está deprimido e doente 1. Reconhece a doença mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, necessidade de repouso 2. Nega estar doente	
18	VARIAÇÃO DIURNA (se há variação dos sintomas pela manhã ou à noite; caso não haja variação, marcar 0) 0. Ausentes 1. Leve 2. Grave	
19	DESPERSONALIZAÇÃO E DESREALIZAÇÃO (Idéias niilistas, sensações de irrealidade) 0. Ausentes 1. Leves 2. Moderadas 3. Graves 4. Incapacitantes	
20	SINTOMAS PARANOIDES 0. Nenhum 1. Desconfiança 2. Idéias de referência 3. Delírio de referência e perseguição	
21	SINTOMAS OBSESSIVOS E COMPULSIVOS 0. Nenhum 1. Leves 2. Graves	

ESCORE TOTAL = _____ PONTOS

Anexo B. Escala Montgomery-Asberg Depression (MADRS)

Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale (MADRS)

The rating should be based on a clinical interview moving from broadly phrased questions about symptoms to more detailed ones which allow a precise rating of severity. The rater must decide whether the rating lies on the defined scale steps (0, 2, 4, 6) or between them (1, 3, 5) and then report the appropriate number. The items should be rated with regards to how the patient has done over the past week.

1. Apparent sadness

Representing despondency, gloom and despair (more than just ordinary transient low spirits), reflected in speech, facial expression, and posture. Rate by depth and inability to brighten up.

- 0 = No sadness.
- 2 = Looks dispirited but does brighten up without difficulty.
- 4 = Appears sad and unhappy most of the time.
- 6 = Looks miserable all the time. Extremely despondent

2. Reported sadness

Representing reports of depressed mood, regardless of whether it is reflected in appearance or not. Includes low spirits, despondency or the feeling of being beyond help and without hope.

- 0 = Occasional sadness in keeping with the circumstances.
- 2 = Sad or low but brightens up without difficulty.
- 4 = Pervasive feelings of sadness or gloominess. The mood is still influenced by external circumstances.
- 6 = Continuous or unvarying sadness, misery or despondency.

3. Inner tension

Representing feelings of ill-defined discomfort, edginess, inner turmoil, mental tension mounting to either panic, dread or anguish. Rate according to intensity, frequency, duration and the extent of reassurance called for.

- 0 = Placid. Only fleeting inner tension.
- 2 = Occasional feelings of edginess and ill-defined discomfort.
- 4 = Continuous feelings of inner tension or intermittent panic which the patient can only master with some difficulty.
- 6 = Unrelenting dread or anguish. Overwhelming panic.

4. Reduced sleep

Representing the experience of reduced duration or depth of sleep compared to the subject's own normal pattern when well.

- 0 = Sleeps as normal.
- 2 = Slight difficulty dropping off to sleep or slightly reduced, light or fitful sleep.
- 4 = Moderate stiffness and resistance
- 6 = Sleep reduced or broken by at least 2 hours.

5. Reduced appetite

Representing the feeling of a loss of appetite compared with when-well. Rate by loss of desire for food or the need to force oneself to eat.

- 0 = Normal or increased appetite.
- 2 = Slightly reduced appetite.
- 4 = No appetite. Food is tasteless.
- 6 = Needs persuasion to eat at all.

6. Concentration difficulties

- Representing difficulties in collecting one's thoughts mounting to an incapacitating lack of concentration. Rate according to intensity, frequency, and degree of incapacity produced.
- 0 = No difficulties in concentrating.
 - 2 = Occasional difficulties in collecting one's thoughts.
 - 4 = Difficulties in concentrating and sustaining thought which reduced ability to read or hold a conversation.
 - 6 = Unable to read or converse without great difficulty.

7. Lassitude

- Representing difficulty in getting started or slowness in initiating and performing everyday activities.
- 0 = Hardly any difficulty in getting started. No sluggishness.
 - 2 = Difficulties in starting activities.
 - 4 = Difficulties in starting simple routine activities which are carried out with effort.
 - 6 = Complete lassitude. Unable to do anything without help.

8. Inability to feel

- Representing the subjective experience of reduced interest in the surroundings, or activities that normally give pleasure. The ability to react with adequate emotion to circumstances or people is reduced.
- 0 = Normal interest in the surroundings and in other people.
 - 2 = Reduced ability to enjoy usual interests.
 - 4 = Loss of interest in the surroundings. Loss of feelings for friends and acquaintances.
 - 6 = The experience of being emotionally paralysed, inability to feel anger, grief or pleasure and a complete or even painful failure to feel for close relatives and friends.

9. Pessimistic thoughts

- Representing thoughts of guilt, inferiority, self-reproach, sinfulness, remorse and ruin.
- 0 = No pessimistic thoughts.
 - 2 = Fluctuating ideas of failure, self-reproach or self-depreciation.
 - 4 = Persistent self-accusations, or definite but still rational ideas of guilt or sin. Increasingly pessimistic about the future.
 - 6 = Delusions of ruin, remorse or irredeemable sin. Self-accusations which are absurd and unshakable.

10. Suicidal thoughts

- Representing the feeling that life is not worth living, that a natural death would be welcome, suicidal thoughts, and preparations for suicide. Suicide attempts should not in themselves influence the rating.
- 0 = Enjoys life or takes it as it comes.
 - 2 = Weary of life. Only fleeting suicidal thoughts.
 - 4 = Probably better off dead. Suicidal thoughts are common, and suicide is considered as a possible solution, but without specific plans or intention.
 - 6 = Explicit plans for suicide when there is an opportunity. Active preparations for suicide.

Anexo C. Escala Young (YMRS)

01. Humor e afeto elevados

Este item compreende uma sensação difusa e prolongada, subjetivamente experimentada e relatada pelo indivíduo, caracterizada por sensação de bem-estar, alegria, otimismo, confiança e ânimo. Pode haver um afeto expansivo, ou seja, uma expressão dos sentimentos exagerada ou sem limites, associada à intensa relação com sentimentos de grandeza (euforia). O humor pode ou não ser congruente ao conteúdo do pensamento.

- (0) Ausência de elevação do humor ou afeto
- (1) Humor ou afeto discreta ou possivelmente aumentados, quando questionado.
- (2) Relato subjetivo de elevação clara do humor; mostra-se otimista, autoconfiante, alegre; afeto apropriado ao conteúdo do pensamento.
- (3) Afeto elevado ou inapropriado ao conteúdo do pensamento; jocoso.
- (4) Eufórico; risos inadequados, cantando.
- (X) Não avaliado

02. Atividade motora - energia aumentada

Este item compreende a psicomotricidade - e expressão corporal - apresentada pelo paciente, incluindo a sua capacidade em controlá-la, variando desde um grau de normalidade, até um estado de agitação, com atividade motora sem finalidade, não influenciada por estímulos externos. O item compreende ainda o relato subjetivo do paciente, quanto à sensação de energia, ou seja, capacidade de produzir e agir.

- (0) Ausente
- (1) Relato subjetivo de aumento da energia ou atividade motora
- (2) Apresenta-se animado ou com gestos aumentados
- (3) Energia excessiva; às vezes hiperativo; inquieto (mas pode ser acalmado).
- (4) Excitação motora; hiperatividade contínua (não pode ser acalmado).
- (X) Não avaliado

03. Interesse sexual

Este item compreende idéias e/ou impulsos persistentes relacionados a questões sexuais, incluindo a capacidade do paciente em controlá-los. O interesse sexual pode restringir-se a pensamentos e desejos não concretizados, em geral verbalizados apenas após solicitação, podendo chegar até a um comportamento sexual frenético e desenfreado, sem qualquer controle ou crítica quanto a riscos e normas morais.

- (0) Normal; sem aumento.
- (1) Discreta ou possivelmente aumentado
- (2) Descreve aumento subjetivo, quando questionado.
- (3) Conteúdo sexual espontâneo; discurso centrado em questões sexuais; auto-relato de hipersexualidade.
- (4) Relato confirmado ou observação direta de comportamento explicitamente sexualizado, pelo entrevistador ou outras pessoas.
- (X) Não avaliado

04. Sono

Este item inclui a redução ou falta da capacidade de dormir, e/ou a redução ou falta de necessidade de dormir, para sentir-se bem-disposto e ativo.

- (0) Não relata diminuição do sono

- (1) Dorme menos que a quantidade normal, cerca de 1 hora a menos do que o seu habitual.
- (2) Dorme menos que a quantidade normal, mais que 1 hora a menos do que o seu habitual.
- (3) Relata diminuição da necessidade de sono
- (4) Nega necessidade de sono
- (X) Não avaliado

05. Irritabilidade

Este item revela a predisposição afetiva para sentimentos/emoções como raiva ou mau-humor apresentados pelo paciente frente a estímulos externos. Inclui baixo-limiar à frustração, com reações de ira exagerada, podendo chegar a um estado constante de comportamento desafiador, querelante e hostil.

- (0) Ausente
- (2) Subjetivamente aumentada
- (4) Irritável em alguns momentos durante a entrevista; episódios recentes (nas últimas 24 horas) de ira ou irritação na enfermaria
- (6) Irritável durante a maior parte da entrevista; ríspido e lacônico o tempo todo.
- (8) Hostil; não cooperativo; entrevista impossível.
- (X) Não avaliado

06. Fala (velocidade e quantidade)

Este item compreende a velocidade e quantidade do discurso verbal apresentado pelo paciente. Inclui sua capacidade de percebê-lo e controlá-lo, por exemplo, frente a solicitações para que permaneça em silêncio ou permita que o entrevistador fale.

- (0) Sem aumento
- (2) Percebe-se mais falante do que o seu habitual
- (4) Aumento da velocidade ou quantidade da fala em alguns momentos; verborrêico, às vezes (com solicitação, consegue-se interromper a fala).
- (6) Quantidade e velocidade constantemente aumentadas; dificuldade para ser interrompido (não atende a solicitações; fala junto com o entrevistador).
- (8) Fala pressionada, ininterruptível, contínua (ignora a solicitação do entrevistador).
- (X) Não avaliado

07. Linguagem - Distúrbio do pensamento

Este item refere-se a alterações da forma do pensamento, avaliado pelas construções verbais emitidas pelo paciente. O pensamento pode estar mais ou menos desorganizado, de acordo com a gravidade das alterações formais do pensamento, descritas a seguir:

Circunstancialidade: fala indireta que demora para atingir o ponto desejado, mas eventualmente vai desde o ponto de origem até o objetivo final, a despeito da superinclusão de detalhes;

Tangencialidade: incapacidade para manter associações do pensamento dirigidas ao objetivo - o paciente nunca chega do ponto inicial ao objetivo final desejado;

Fuga de idéias: verbalizações rápidas e contínuas, ou jogos de palavras que produzem uma constante mudança de uma idéia para outra; as idéias tendem a estar conectadas e, mesmo em formas menos graves, podem ser difíceis de ser acompanhadas pelo ouvinte;

Ecolalia consonante: repetição automática de palavras ou frases, com entonação e forma que produzem efeito sonoro de rima;

Incoerência: fala ou pensamento essencialmente incompreensíveis aos outros, porque as

palavras ou frases são reunidas sem uma conexão com lógica e significado.

- (0) Sem alterações
- (1) Circunstancial; pensamentos rápidos.
- (2) Perde objetivos do pensamento; muda de assuntos freqüentemente; pensamentos muito acelerados
- (3) Fuga de idéias; tangencialidade; dificuldade para acompanhar o pensamento; ecolalia consonante
- (4) Incoerência; comunicação impossível.
- (X) Não avaliado

08. Conteúdo

Este item compreende idéias e crenças apresentadas pelo paciente, variando, de acordo com a intensidade, de idéias novas e/ou incomuns ao paciente, ideação supervalorizada (ou seja, crença falsa, intensamente arraigada, porém susceptível à argumentação racional), a delírios (crenças falsas, baseadas em inferências incorretas sobre a realidade, inconsistentes com a inteligência e antecedentes culturais do paciente, e que não podem ser corrigidas pela argumentação). Conteúdos comumente encontrados no paciente maniaco, incluem:

- ☐ *Idéias místicas*: de conteúdo religioso;
- ☐ *Idéias paranóides*: crença de estar sendo molestado ou perseguido;
- ☐ *Idéias de grandeza*: concepção exagerada da própria importância, poder ou identidade, incluindo posses materiais, qualidades incomuns e relacionamentos especiais com personalidades famosas ou entidades místicas;
- ☐ *Idéias de referência*: crença de que o comportamento dos outros tem relação consigo próprio ou de que eventos, objetos ou outras pessoas possuem um significado particular e incomum para si.

- (0) Normal
- (2) Novos interesses e planos compatíveis com a condição sócio-cultural do paciente, mas questionáveis.
- (4) Projetos especiais totalmente incompatíveis com a condição sócio-econômica do paciente; hiper-religioso.
- (6) Idéias supervalorizadas
- (8) Delírios
- (X) Não avaliado

09. Comportamento disruptivo agressivo

Este item compreende a atitude e as respostas do paciente ao entrevistador e à situação da entrevista. O paciente pode apresentar-se desconfiado ou irônico e sarcástico, mas ainda assim respondendo aos questionamentos, ou então não cooperativo e francamente agressivo, inviabilizando a entrevista.

- (0) Ausente, cooperativo.
- (2) Sarcástico; barulhento, às vezes, desconfiado.
- (4) Ameaça o entrevistador; gritando; entrevista dificultada.
- (6) Agressivo; destrutivo; entrevista impossível.
- (X) Não avaliado

10. Aparência

Este item compreende a apresentação física do paciente, incluindo aspectos de higiene, asseio e modo de vestir-se.

- (0) Arrumado e vestido apropriadamente
- (1) Descuidado minimamente; adornos ou roupas minimamente inadequados ou exagerados.
- (2) Precariamente asseado; despenteado moderadamente; vestido com exagero.
- (3) Desgrenhado; vestido parcialmente; maquiagem extravagante.
- (4) Completamente descuidado; com muitos adornos e adereços; roupas bizarras.
- (X) Não avaliado

11. *Insight (discernimento)*

Este item refere-se ao grau de consciência e compreensão do paciente quanto ao fato de estar doente. Varia de um entendimento adequado (afetivo e intelectual) quanto à presença da doença, passando por concordância apenas frente à argumentação, chegando a uma negação total de sua enfermidade, referindo estar em seu comportamento normal e não necessitando de qualquer tratamento.

- (0) Insight presente: espontaneamente refere estar doente e concorda com a necessidade de tratamento
- (1) Insight duvidoso: com argumentação, admite possível doença e necessidade de tratamento.
- (2) Insight prejudicado: espontaneamente admite alteração comportamental, mas não a relaciona com a doença, ou discorda da necessidade de tratamento.
- (3) Insight ausente: com argumentação, admite de forma vaga alteração comportamental, mas não a relaciona com a doença e discorda da necessidade de tratamento.
- (4) Insight ausente: nega a doença, qualquer alteração comportamental e necessidade de tratamento.
- (X) Não avaliado

Anexo D. Escala Montgomery-Asberg Depression (MRS)

Modified Rankin Scale (MRS)

- 0 No symptoms
 - 1 No significant disability, despite symptoms; able to perform all usual duties and activities
 - 2 Slight disability; unable to perform all previous activities but able to look after own affairs without assistance
 - 3 Moderate disability; requires some help, but able to walk without assistance
 - 4 Moderately severe disability; unable to walk without assistance and unable to attend to own bodily needs without assistance
 - 5 Severe disability; bedridden, incontinent, and requires constant nursing care and attention
 - 6 Death
-

Anexo A. Escala ALDA

CrITÉRIOS Retrospectivos da Resposta Terapêutica de Longo Prazo em Pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar

Nome: _____ Data: _____ Droga: _____ Avaliador: _____

CrITÉRIO A	CrITÉRIOS B
<p>O critério A é usado para determinar associação entre melhora clínica e tratamento. A análise deve se referir ao período de tratamento considerado adequado em termos de duração e dosagem das medicações. A atividade da doença deve ser avaliada quanto a frequência, severidade e duração dos episódios.</p> <p>10 = Resposta completa. Sem recorrência na vigência de tratamento adequado, sem sintomas residuais, recuperação funcional completa</p> <p>9 = Ótima resposta. Sem recorrência de episódios, porém o paciente pode ter sintomas residuais mínimos (ansiedade transitória, alterações no padrão do sono, disforia, irritabilidade) sem que seja necessária qualquer intervenção</p> <p>8 = Ótima resposta. Atividade da doença reduzida mais que 90%</p> <p>7 = Boa resposta. Atividade da doença reduzida em 80-90%</p> <p>6 = Boa resposta. Atividade da doença reduzida em 65-80%</p> <p>5 = Resposta moderada. Atividade da doença reduzida em 50-65%</p> <p>4 = Resposta moderada. Atividade da doença reduzida em 35-50%</p> <p>3 = Melhora leve. Atividade da doença reduzida em 20-35%</p> <p>2 = Melhora leve. Atividade da doença reduzida em 10-20%</p> <p>1 = Melhora mínima. Atividade da doença reduzida em 0-10%</p> <p>0 = Sem mudança ou piora</p> <p style="text-align: right;">Total de pontos Critério A: _____</p>	<p>Os critérios B são usados para estabelecer se existe uma relação causal entre melhora clínica e o tratamento instituído. Atribua 0, 1 ou 2 pontos para cada item.</p> <p>B1: Número de episódios antes do tratamento: 0 = 4 ou mais episódios 1 = 2 ou 3 episódios 2 = 1 episódio B1: _____</p> <p>B2: Frequência dos episódios antes do tratamento: 0 = Moderada a alta, incluindo ciclagem rápida 1 = Baixa, com remissões espontâneas, de três anos ou mais em média 2 = 1 único episódio, risco de recorrência não pode ser estabelecido B2: _____</p> <p>B3: Duração do tratamento: 0 = 2 ou mais anos 1 = 1 a 2 anos 2 = Menos que 1 ano B3: _____</p> <p>B4: Adesão durante período de estabilidade: 0 = Excelente; documentado por dosagens séricas em nível terapêutico 1 = Boa; mais que 80% das dosagens séricas em nível terapêutico 2 = Pobre; repetidamente abandona tratamento, menos que 80% das dosagens séricas em nível terapêutico B4: _____</p> <p>B5: Uso de medicação adicional durante período de estabilidade. 0 = Nenhuma, exceto medicação para dormir eventual (uso semanal ou menor frequência); sem outros estabilizadores do humor, antidepressivos ou antipsicóticos para controle dos sintomas 1 = Antidepressivos em baixa dose ou antipsicóticos "por segurança" ou uso prolongado de medicação para dormir 2 = Uso prolongado ou sistemático de antidepressivos ou antipsicóticos B5: _____</p> <p style="text-align: right;">Total de pontos Critérios B: _____ Total de pontos da escala (subtrair B de A): _____</p>

Anexo B. Aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Farmacogenética do lítio: marcadores de refratariedade em pacientes com transtorno bipolar.

Pesquisador: Wagner Farid Gattaz

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 52575215.9.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.572.204

Apresentação do Projeto:

Os sais de lítio são utilizados no tratamento dos transtornos do humor há mais de 50 anos. É a principal medicação prescrita para pacientes com diagnóstico de transtorno afetivo bipolar (TAB), enfermidade apontada por sintomas de mudanças recorrentes do humor, representadas por episódios cíclicos de mania ou hipomania, e depressão. Apesar de o tratamento com lítio apresentar boa resposta clínica, aproximadamente 35%

dos pacientes não respondem satisfatoriamente, ou seja, são refratários ao tratamento. Tendo em vista a importância do uso do lítio no tratamento de TAB e a influência de fatores genéticos na variabilidade da biodisponibilidade do medicamento e em seus efeitos (95%), é de extrema importância esclarecer a farmacogenética envolvida na resposta ao lítio. Serão recrutados 60 pacientes bipolares respondedores ao tratamento com lítio e 60 pacientes bipolares refratários ao tratamento com lítio com idade de 18 a 65 anos dos ambulatórios do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-HC-FMUSP). O tamanho da amostra (Lwanga, 1991) foi estimado em 120 indivíduos, considerando a proporção de bipolaridade na população de 3% (Kessler et al., 2005; Pfennig et al., 2013), a precisão absoluta de 3% e o nível de significância de 5%

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cexpesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.572.204

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar polimorfismos de DNA em genes envolvidos com mecanismos de ação do lítio a qual interagem com a resposta terapêutica no transtorno bipolar. Detectar, em pacientes com transtorno bipolar, possíveis marcadores genéticos que determinem

ausência de resposta ao tratamento medicamentoso.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar polimorfismos de DNA potencialmente associados com a resposta ao tratamento em genes envolvidos na farmacodinâmica do lítio pela

análise dos principais polimorfismos nos genes: GSK3, CREB, BDNF e NTRK2. 2. Avaliar os polimorfismos dos genes selecionados em pacientes diagnosticados com transtorno bipolar respondedores e em pacientes refratários ao tratamento com lítio. 3. Associar os resultados genotípicos obtidos com os dados clínicos de resposta ao tratamento farmacológico e identificar potenciais polimorfismos marcadores da refratariedade

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos (entrevistas e coleta de sangue).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com objetivos bem definidos, tem finalidade acadêmica (mestrado).

Metodologia adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE reviso e escrito em linguagem clara e compreensível.

Recomendações:

Sem pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010

UF: SP Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2881-7585 Fax: (11)2881-7585

E-mail: capesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.572.204

devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP Interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES BÁSICAS DO PROJETO 562819.pdf	12/04/2016 15:19:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TB_arumado_12abril2016.doc	12/04/2016 14:54:01	Wagner Farid Gattaz	Aceito
Outros	3350_0001.pdf	02/10/2015 11:26:32	Wagner Farid Gattaz	Aceito
Folha de Rosto	3349_0001.pdf	02/10/2015 11:25:31	Wagner Farid Gattaz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Refratariedade do Ilglio - Pós- parecer Oficial 20-07-2015.docx	05/08/2015 10:05:26		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Junho de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2881-7585 Fax: (11)2881-7585 E-mail: cappelq.edm@hc.fm.usp.br

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcantara I, et al. Avanços no diagnóstico do transtorno do humor bipolar. *R Psiquiatr.* 2003; 1: 22 – 32.

Alda M, et al. Investigating responders to lithium prophylaxis as a strategy for mapping susceptibility genes for bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005; 29(6): 1038 – 45.

Alda M, et al. Alterations in phosphorylated cAMP response element-binding protein (pCREB) signaling: an endophenotype of lithium-responsive bipolar disorder? *Bipolar Disorders.* 2013; 15: 824 – 831.

Alda M. Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics. *Mol Psychiatry.* 2015; 20(6): 661 – 70.

American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais* (4a. ed.; Texto Revisado). Porto Alegre, Artmed, 2002.

American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais* (5a. ed.; Texto Revisado). Porto Alegre, Artmed, 2014.

Arya M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Ver Mol Diagn.* 2005; 5(2): 209 – 19.

Ashok AH, et al. The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. *Mol Psychiatry.* 2017; 22: 666 – 79.

Beaulieu JM. A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. *J Psychiatry Neurosci.* 2012; 37: 7–16.

Begley CE, et al. The lifetime cost of bipolar disorder in the US: an estimate for new cases in 1998. *Pharmacoeconomics.* 2001; 19: 483 – 95.

Benetti F, et al. A single nucleotide polymorphism in glycogen synthase kinase 3 – B promoter gene influences onset of illness in patients affected by bipolar disorder. *Neuroscience Letter.* 2004; 355: 37 – 40.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J.* 1982; 206(3): 587 – 95.

Brenner C, Shyn SI. Diagnosis and management of bipolar disorder in primary care. *Med Clin North Am.* 2014; 98 (5): 1025 – 48.

Briggs KT, et al. A molecular model for lithium's bioactive form. *Biophysical Journal*. 2016; 111(2): 294 – 300.

Brunello N, Tascedda F. Cellular mechanisms and second messengers: relevance to the psychopharmacology of bipolar disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2003; 6(2): 181–89.

Cade JF. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust*. 1949; 2(10): 349 – 52.

Can A, Schulze TG, Gould TD. Molecular actions and clinical pharmacogenetics of lithium therapy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014; 123(3): 1 – 36.

Chen KP, Shen WW, Lu ML. Implication of serum concentration monitoring in patients with lithium intoxication. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2004; 58: 25–29.

Chen RW, Chuang D.M. Long Term Lithium Treatment Suppresses p53 and Bax Expression but Increases Bcl-2 Expression. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1999; 274(10): 6039 – 42.

Chen RW, et al. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J Neurochem*. 2003; 84: 566–75.

Chiu CT, Chuang DM. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacol Ther*. 2010; 128(2): 281 – 304.

Clayton TA, et al. Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*. 2006; 440(7087): 1073 - 7.

Clevers H. Wnt-beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006; 127(3): 469 – 80.

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; 92: 277 – 281.

de CID R, et al. BDNF variability in opioid addicts and response to methadone treatment: preliminary findings. *Genes, Brain and Behavior*. 2008; 7: 515 – 22.

Desjardins P, Conklin D. Nanodrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010; 45: 1 – 4.

Dilsaver SC. An estimate of the minimum economic burden of bipolar I and II disorders in the United States: 2009. *J. Affect. Disord*. 2011; 129: 79 – 83.

Dmitrzak-Weglarz D, et al. Association studies of the BDNF and the NTRK2 gene polymorphisms with prophylactic lithium response in bipolar patients. *Pharmacogenomics*. 2008; 9(11): 1595 – 03.

Doherty JL, Owen MJ. Genomic insights into the overlap between psychiatric disorders: implications for research and clinical practice. *Genome Med*. 2014; 6(4): 1 – 13.

El-Mallakh RS. Ion homeostasis and the mechanism of action of lithium. *Clin Neurosci Res*. 2004; 4: 227–31.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle: separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*. 1980; 107: 519–27.

Faedda GL, et al. Clinical risk factor for bipolar disorders: a systematic review of prospective studies. *J Affect. Disord*. 2014; 168: 314 – 21.

Fountoulakis KN. Refractoriness in Bipolar Disorder: Definitions and Evidence-Based Treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2011; 18(2012): 227 – 37.

Geddes JR, et al. Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Psychiatry*. 2004; 161(2): 217 – 22.

Geoffroy PA. Circadian biomarkers in patients with bipolar disorder: promising putative predictors of lithium response. *Int J Bipolar Disord*. 2014; 2 – 5.

Goodwin RD. Association between physical activity and mental disorders among adults in United States. *Prev. Med*. 2003; 36(6): 698 – 703.

Grandjean EM, Aubry JM. Lithium: Updated Human Knowledge Using an Evidence-Based Approach. Part II: Clinical Pharmacology and Therapeutic Monitoring. *CNS Drugs*. 2009; 23(4) p. 331- 349.

Grewal SS, York, RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signaling in neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 1999; 9(5): 544 – 53.

Grimes CA, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem*. 2001; 78: 1219–32.

Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*. 2001; 65(4): 391 – 426.

Grof P, Duffy A, Cavazzoni P, Grof E. Is response to prophylactic lithium a familial trait? *J Clin Psychiatry*. 2002; 63: 942–7.

Grof P, et al. Is response to prophylactic lithium a familial trait? *J Clin Psychiatry*. 2002; 63: 942 – 47.

Grof P, et al. Lithium response and genetics of affective disorders. *J. Affect Disord*. 1994; 32: 85 – 95.

Hamilton MA. Rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 1960; 23(56): 56 – 61.

Hashimoto R, et al. Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *J Neurochem*. 2002; 80: 589–97.

Heid CA, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6(10): 986 – 94.

Heilbronner HL, et al. Genetic variants associated with response to lithium treatment in bipolar disorder: a genome-wide association study. *Lancet*. 2016; 387(10023): 1085 – 93.

Johnson SL, Edge MD, Holmes MK, Carver CS. The behavioral activation system and mania. *Annu Rev Clin Psychol*. 2012; 8: 243 – 67.

Joje RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24: 441–43.

Kariyazono H, et al. Rapid detection of the 22q11.2 deletion with quantitative real-time PCR. *Mol Cell Probes*. 2001; 15(2): 71 – 3.

Kapczinski F, et al. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*. 2008; 8: 1101 – 1113.

Kim Y, Santos R, Gage FH, Marchetto, M.C. Molecular mechanisms of bipolar disorder: progress made and future challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017; 11 (30): 1 -15.

Kleindienst N, Engel RR, Greil W. Which clinical factors predict response to prophylactic lithium? A systematic review for bipolar disorder. *Bipolar Disorder*. 2005; 7: 404 – 17.

Komoroski RA, Pearce JM, Mrak RE. ³¹P NMR spectroscopy of phospholipid metabolites in post-mortem schizophrenic brain. *Magn Reson Med*. 2008; 59(3): 469 – 74.

Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet*. 2001; 27(3): 234 – 6.

Kubista M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006; 27(2-3): 95 – 125.

Kwok JBJ, et al. *GSK3B* polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *American Neurological Association*. 2005; 58: 829 – 39.

Lee LG, Connel, CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21(16): 3761 – 66.

Lee YJ, Kim YK. The impact of glycogen synthase kinase 3 β gene on psychotic mania in bipolar disorder patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2011; 35: 1303 – 1308.

Lenox R, Hahn CG. Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2000; 61(9): 5 – 15.

Leverich GS, et al. The poor prognosis of childhood-onset bipolar disorder. *J.Pediatr*. 2007; 150 (5): 485 – 90.

Li X, Frye MA, Shelton RC. Review of Pharmacological Treatment in Mood Disorders and Future Directions for Drug Development. *N Euro-psychopharmacology*. 2012; 37: 77 – 101.

Liker K. Genetic Testing. Disponível em: <<http://genetics.thetech.org/ask-a-geneticist/how-gwas-works>>. Acesso em: 23 mai. 2018.

Lima MS, Tassi J, Novo IP, Mari JJ. Epidemiologia do transtorno bipolar. *Revista Psiquiatria Clinica*. 2005; 1: 15 – 20.

Lin YF, Huang MC, Liu HC. Glycogen synthase kinase 3B gene polymorphisms may be associated with bipolar I disorder and the therapeutic response to lithium. *Journal of affective disorders*. 2013; 147: 401 – 6.

Machado-Vieira R. Lithium, Stress, and Resilience in Bipolar Disorder: Deciphering this key homeostatic synaptic plasticity regulator. *Journal of Effective Disorders*. 2017; 18: 31862 - 7.

Mai L, Jopes RS, Li X. BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3 β and mood stabilizing agents. *J Neurochem*. 2002; 82(1): 75 – 83.

Malhi GS, et al. The lithium Battery: assessing the neurocognitive profile of lithium in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2016; 18(2): 102 -15.

Mamdani F, et al. No association between the *PREP* gene and lithium responsive bipolar disorder. *BMC Psychiatry*. 2007; 7(9): 1 – 6.

Mamdani F, MANN L, et al. Lithium Response and Genetic Variation in the CREB Family of Lithium preferentially inhibits adenylyl cyclase V and VII isoforms. *Int. J.Neuropsychopharmacol*. 2008; 11(4): 533 – 9.

Mamdani F. Coding and noncoding gene expression biomarkers in mood disorders and schizophrenia. *Dis Markers*. 2013; 35(1): 11 – 21.

Manchia M, et al. Assessment of response to lithium maintenance treatment in bipolar disorder: A Consortium on Lithium Genetics (ConLiGen) *Plos One*. 2013; 8(6): 1 – 9.

Manji HK, et al. Regulation of signal transduction pathways by mood stabilizing agents: implications for the delayed onset of therapeutic efficacy. *Journal of Clinical Psychiatry*. 1996; 57: 34– 46.

Manji HK, Lenox RH. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2000; 48(6): 518–30.

Manji HK, et al. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult- to-treat depression. *Biol. Psychiatry*. 2003; 53: 707 – 42.

Mann L, Heldman E, Bersudsky Y, et al. Inhibition of specific adenylyl cyclase isoforms by lithium and carbamazepine, but not valproate, may be related to their anti-depressant effect. *Bipolar Disord*. 2009; 11: 885–96.

Marmol, F. Lithium: bipolar disorder and neurodegenerative diseases. Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32(8): 1761–71.

Matsuo K, et al. Neuronal Correlates of Brain-derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism and Morphometric Abnormalities in Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34: 1904 –13.

McCarthy MJ, Leckband SG, Kelsoe JR. Pharmacogenetics of lithium response in bipolar disorder. *Pharmacogenomics*. 2010; 11(10):1439 – 65.

McMahon FJ, Schulze TG. Bipolar disorder as a phenotype in genetic studies. *Clinical Neuroscience Research*. 2005; 5: 37 – 43.

Mendlewicz, J. New genetic concepts in manic-depressive psychosis. *Acta Psychiatr Belg*. 1973; 73(2): 209 – 32.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16(3): 1215.

Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Brit. J. Psychiat*. v. 134, p. 382 – 389, 1979.

Mroziwicz M, Tyndale RF. Pharmacogenetics: a tool for identifying genetic factors in drug dependence and response to treatment. *Addict Sci Clin Pract*. 2010; 5(2): 17 – 29.

Nikolaus M, et al. Acute mania is accompanied by elevated glutamate/glutamine levels within the left dorsolateral prefrontal cortex. *Psychopharmacology*. 2003; 168: 344 – 46.

O'Brien WT, Klein PS. Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37: 1133 – 8.

Ozdemir V, et al. Public health pharmacogenomics and the design principles for global public goods – moving genomics to responsible innovation. *Curr Pharmacogenomics Person Med.* 2013; 11(1):1 – 4.

Pennisi E. A closer look at SNPs suggests difficulties. *Science.* 1998; 281(5384): 1787 – 9.

Pereira LL, et al. Bipolar disorder: reflections on the diagnosis and on the treatment. *Perspectiva.* 2010; 34 (128):151 – 66.

Pisani C, Melis C, Squassina A. Lithium pharmacogenetics: Where do we stand? *Drug Development Research.* 2016; 77(7): 368 – 73.

Post RM, et al. Early-onset bipolar disorder and treatment delay are risk factors for poor outcome in adulthood. *J Clin Psychiatry.* 2010; 71(7): 864 – 72.

Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate JCA, et al. Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology.* 2010; 62(1): 50–60.

Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60: II. Prognostic. *Scott Med J Med.* 1957; 2: 200 – 215.

Rantamaki T, et al. The effects of acute and long-term lithium treatments on trkBneurotrophin receptor activation in the mouse hippocampus and anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology.* 2006; 50(1): 421 – 7.

Rybakowski JK. Bipolar and inadequate response to antidepressant drugs: Clinical and psychopharmacological perspective. *Affective Disorders.* 2012; 136(1 – 2): 13 – 19.

Rybakowski JK. Response to Lithium in Bipolar Disorder: Clinical and Genetic Findings. *ACS Chem. Neurosci.* 2014; 5(6): 413 – 21.

Rybakowski JK. Two generations of mood stabilizers. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007; 10: 709 – 11.

Salloum MC, McCarthy MJ, Leckband SG, KELSEY JR. Towards the clinical implementation of pharmacogenetics in bipolar disorder. *BMC Medicine.* 2014; 12(90): 1 – 15.

Saxena A, et al. Role of Protein Kinase C in Bipolar Disorder: A Review of the Current Literature. *Mol Neuropsychiatry.* 2017; 3: 108 – 24.

Schaad NW, et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003; 41: 305 – 24.

Schou M, Juel-Nielsen N, Stromgren E, Voldby H. The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. *J Neurol Neurosug Psychiatry.* 1954; 17(4): 250 – 60.

Schulze TG, et al. The International Consortium on Lithium Genetics (ConLiGen): An Initiative by the NIMH and IGSLI to Study the Genetic Basis of Response to Lithium Treatment. *Neuropsychobiology.* 2010; 62: 72 – 8.

Sears C, et al. Evidence of associations between bipolar disorder and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Bipolar Disord.* 2011; 13(7) – 8: 630 – 637.

Serretti A, Drago A. Pharmacogenetics of Lithium Long-Term Treatment: Focus on Initiation and Adaptation Mechanisms. *Neuropsychobiology.* 2010; 62: 61 – 71.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 131- 6.

Silva, LFAL, et al. Assessing treatment response to prophylactic lithium use in patients with bipolar disorder. *J Bras Psiquiatr.* 2016; 65(1): 9 – 16.

Smeraldi E. et al. Outcomes on lithium treatment as a tool for genetic studies in affective disorders. *J. Effect Disord.* 1984; 6(2): 139 – 51.

Smoller JW, Finn CT. Family, twin and adoption studies of bipolar disorder. *Am J. Med Genet C Semin Med Genet.* 2003; 123C(1): 48 – 58.

Strober M, et al. A family study of bipolar I disorder in adolescence. Early onset of symptoms linked to increased familial loading and lithium resistance. *J. Effect Disord.* 1988; 15(3): 255 – 68.

Toker L, Agam G. Lithium, inositol and mitochondria. *ACS Chem Neurosci.* 2014; 5(6): 411 – 12.

Tondo L, Baldessarini RJ. Long-term lithium treatment in the prevention of suicidal behavior in bipolar disorder patients. *Epidemiol Psichiatri Soc.* 2009; 18(3): 179 – 83.

Tsapakis EM, Travis MJ. Glutamate and psychiatric disorders. *Adv. Psychiatr. Treat.* 2002; 8: 189–97.

Valones MAA, et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol.* 2009; 40(1): 1 – 11.

Vosahlikova M, Svoboda P. Lithium – therapeutic tool endowed with multiple beneficiary effects caused by multiple mechanisms. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2016; 76(1): 1 – 19.

Walton MR, Dragunow I. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci*. 2000; 23(2): 48 – 53.

Wang J et al. Mutual interaction between YAP and CREB promotes tumorigenesis in liver câncer. *Hepatology*. 2013; 58(3): 1011 – 20.

Wang Z. Association of BDNF Gene Polymorphism with Bipolar Disorders in Han Chinese Population. *Genes, Brain and Behavior*. 2012; 11: 524 – 8.

Williams RSB, Harwood AJ. Lithium therapy and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000; 21(2): 61 – 4.

Winham SJ, et al. Bipolar disorder with comorbid binge eating history: A genome-wide association study implicates *APOB*. *J Affect Disord*. 2014; 165: 151 – 158.

Wolf CR, Smith G, Smith RL. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. *BMJ*. 2000; 320(7240): 987 – 90.

Young AH, Hammond JM. Lithium in mood disorders: increasing evidence base, declineing use? *Br J Psychiatry*. 2007; 191: 474- 6.

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

Zhou SF, et al. Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab*. 2008; 9(8): 738 – 784.

APÊNDICE

Apêndice – Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1.

NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____ APT

O: _____ BAIRRO: _____ CIDADE: _____

____ CEP: _____ TELEFONE: DDD
(____) _____

2. RESPONSÁVEL

LEGAL: _____

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

Nº: _____

APTO: _____ BAIRRO: _____

____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD

(____) _____ CEL: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Farmacogenética do lítio: marcadores de refratariedade em pacientes com transtorno bipolar**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Wagner FaridGattaz

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular/Psiquiatria INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 25956

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Neurociências (LIM-27), Departamento de Psiquiatria.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

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

1- Desenho e objetivos do estudo:

2- Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

3- Desconfortos e riscos esperados:

4- Potenciais benefícios para o participante:

5- **Garantia de acesso:** Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Wagner FaridGattaz, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 785, Instituto de Psiquiatria, 1º andar, CEP 05403-010, São Paulo (SP), Telefone (11) 2661-7283. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – Prédio da

Administração, 5º andar – Tel: 2661-7585 ou 2661-6442 (ramais 16 e 17), e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

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

7- Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: Farmacogenética do lítio: marcadores de refratariedade em pacientes com transtorno bipolar.

Eu discuti com o Dr. Wagner Farid Gattaz sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data: ____/____/____

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

Data: ____/____/____

(Somente para o responsável do estudo)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____/____/____