Leandro Michelon

Investigação da associação de variantes polimórficas, sítios de metilação e tamanho de telômeros com resposta a longo prazo de lítio em transtorno bipolar

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

Programa de Psiquiatria
Orientador Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 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

Michelon, Leandro
Investigação da associação de variantes polimórficas, sítios de metilação e tamanho de telômeros com resposta a longo prazo de lítio em transtorno bipolar / Leandro Michelon. -- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado) --Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.
Orientador: Homero Pinto Vallada Filho.

Descritores: 1.Farmacogenética 2.Lítio 3.Transtorno bipolar 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.Metilação de DNA 6.Telômero

USP/FM/DBD-172/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista. CRB-86755

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os pacientes que cruzaram o meu caminho e me fizeram pensar na minha vida e na vida dos demais. Ainda não compreendi as motivações do comportamento humano, mas vou continuar tentando.

Em especial agradeço muito a minha família, José Luiz, Tereza e Karine, que com esforço permitiram que me dedicasse exclusivamente aos estudos até terminar a faculdade.

Agradeço a César, Rute e Moacyr pelo carinho e apoio nas horas difíceis do caminho.

Devo muito a Karen Miguita, Thaís Chile, Isabela Moraes e Caroline Camilo por darem suporte e realizarem as atividades laboratoriais exaustivas e minuciosas. O esforço foi grande e a torcida também.

Agradeço a Cintia Oliveira, Sidnéia Perez, Renata Rizzo e André Luís Fabricio que contribuíram na coleta de informação e se tornaram grandes amigos.

Adriano Araújo e Kátia Ichi sempre dispostos a ajudar no que eu precisei, mesmo não sendo obrigações deles, saibam que os tenho no coração.

A Vanessa De Paula, que ajudou em momento crucial, serei sempre grato pela bondade.

Agradeço aos amigos Prof. Dr. Quirino Cordeiro e Prof. Dr. Roberto Ratzke, que ajudaram em permitir acesso aos pacientes de suas instituições.

Aos participantes da banca de qualificação, Prof. Dr. Hélio Elkis, Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza e Prof. Dr. Teng Chei Tung, pelos comentários e sugestões, os quais procurei atender dentro do possível, manifesto meu respeito e admiração que se traduziu no convite para que participassem daquele momento.

E finalmente agradeço ao Prof. Dr. Homero P. Vallada Filho, grande alma, ensinante da vida, e que me entusiasmou a concluir essa tarefa de deixar um pouco mais de conhecimento para que os mais jovens possam agregá-los a algo maior.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos os que sofrem de transtornos mentais, rogo que persistam. Estamos lutando juntos para um futuro melhor.

« Les médecins administrent des médicaments dont ils savent très peu, à des malades dont ils savent moins, pour guérir des maladies dont ils ne savent rien. »

François-Marie Arouet (1694–1778)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

a) 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.

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

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

d) As notações referentes ao símbolo e nome dos genes e codificação de suas variantes polimórficas seguem a padronização do *National Center for Biotechnology Information*.

e) O posicionamento das variantes e sítios de metilação seguem as adotadas pelo *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly.*

Sumário

Lista de siglas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Summary

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Transtorno bipolar 3
2.2 Uso de lítio no transtorno bipolar 10
2.2.1 Variáveis clínicas associadas à resposta ao lítio 17
2.2.2 O problema da aderência sobre eficácia ao tratamento 25
2.3 Fenótipo de resposta ao lítio 29
2.3.1 Mensuração da resposta profilática ao lítio 31
2.4 Mecanismos de ação do lítio relacionados a seu efeito terapêutico 38
2.4.1 Penetração em barreira hematoendefálica e membrana neuronal 39
2.4.2 Ação em proteínas ligadas à membrana 41
2.4.3 Ação sobre a função sináptica 43
2.4.4 Ação sobre a neuroplasticidade 45
2.4.5 Ação na regulação do ciclo do inositol 46
2.4.6 Ação sobre proteínas quinase em vias de sinalização intracelular 49
2.4.7 Ação sobre vias de sinalização imunoinflamatórias 52
2.4.8 Ação sobre a dinâmica mitocondrial 53
2.4.9 Ação sobre mecanismos de autofagia 55
2.4.10 Ação sobre controle de apoptose 58
2.4.11 Ação sobre ciclos biológicos e ritmos circadianos 61
2.4.12 Ação sobre a plasticidade sináptica 62
2.4.13 Ação sobre o comprimento de telômeros 64
2.5 Genética do lítio 70
2.6 Epigenética do lítio 75
2.7 Integração de dados biológicos 88
3 OBJETIVOS 94
4 MÉTODOS 96
4.1 Casuística 96
4.2 Avaliação de resposta ao lítio 97
4.3 Escolha dos genes e variantes para investigação 98
4.4 Métodos de laboratório 101
4.4.1 Extração de DNA de sangue total 101
4.4.2 Genotipagem 101
4.4.3 Avaliação do comprimento dos telômeros 104
4.4.4 Análise da metilação do DNA. 105
4.5 Análise estatística 108

5 RESULTADOS.....110
5.1 Topologia da rede de genes.....110
5.2 Caracterização da amostra.....112
5.3 SNPs e metilação.....119
5.4 Resposta terapêutica, SNPs e metilação 123
5.5 Telômeros 123
5.6 Análise da interação entre genes e sítios de metilação na determinação da resposta terapêutica ao lítio.....124
6 DISCUSSÃO..... 127
7 CONCLUSÕES..... 139
8 ANEXOS 141
9 REFERÊNCIAS 147

SIGLAS

5-HT - *5-hidroxitriptamine (serotonin)*
5-HT1A - *Serotonin receptor*
5-HTTLPR - *serotonin-transporter-linked polymorphic region*
AC – Adenilil Ciclase
ACCN1 - *amiloride-sensitive cation channel 1*
AKT - *Protein kinase B (PKB)*
AMI – *Affective Morbidity Index*
AMPA - *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*
ANK3 - *Ankyrin-3*
APP – *Amyloid beta precursor protein*
ATP – Trifosfato de adenosina
BAX – *B-cell lymphoma 2 associated X protein*
BCL2 - *B-cell lymphoma 2*
BCL2L11 – *BCL2 Like 11*
BCR - *breakpoint cluster region*
BDNF - *Brain derived neurotrophic factor*
BDNF-Met - alelo codificante de metionina do polimorfismo Val66Met do BDNF
BMAL1/ARNTL – *Basic helix-loop-helix/PAS protein*
BPRS – *Brief Psychiatric Rating Scale*
BRCA1 – *Breast Cancer 1*
CACNA1C - *calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit*
CACNB4 - *calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit*
cAMP - *cyclic adenosine monophosphate*
CGI – *Clinical Global Impression*
CLOCK - *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
ConLi^{+}Gen – *Consortium on Lithium Genetics*
CREB - *cAMP response element-binding*
CYP450 - *Cytochrome 450*
DAG – Diacilglicerol
DAT – Receptor de Recaptação de Dopamina
DM – Depressão Maior
DMI – Depressão-Mania-Intervalo
DNA - *Deoxyribonucleic acid*
DNMT - *DNA methyltransferase*
DNMT1 - *DNA methyltransferase 1*
DSM-5 – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th Edition*
ER\RE – Retículo endoplasmático
EWAS – *Epigenome wide association study*
FDA – *Food and Drug Administration*
FDR - *False Discovery Rate*
FKBP8/FKBP5 – *FKBP Propyl Isomerase 8/FKBP Propyl Isomerase 5*
GABA – Ácido gama-aminobutírico

GABRA4 - *gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4*
GAF – *Global Assessment of Functioning*
GAT – *GABA transporter*
GO – *Gene Ontology*
GRIA2 - *glutamate receptor, ionotropic, AMPA2*
GRIA4 - *glutamate receptor, ionotropic, AMPA4*
GSK3B/GSK3β - *glycogen synthase kinase 3beta*
GWAS – *Genome-wide association study*
HAM–D – *Hamilton Depression Rating Scale*
HDACs - *Histone deacetylases*
hTERT – *human Telomerase reverse transcriptase*
HSP90AA1 - *Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1*
HTS – *High-throughput sequencing*
IGF1 - *Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)*
IL-11 - *Interleucine-11*
IMC – Índice de Massa Corporal
IMPASE – Inositol monofosfatase
IPP1 – Inorganic diphosphatase
IPPASE – Inositol polifosfatase
IRS1 – *Insuline receptor substrate 1*
KCNH2 - *Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2*
KEEG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LCR - Líquido Cefalorraquidiano
LTD – *Long term depression*
LTL – *Leucocyte telomere length*
LTP – *Long term potentiation*
MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*
MDI – Mania-Depressão-Intervalo
mTOR - *Mechanistic target of rapamycin*
NCBI – *National Institute of Biotechnology Information*
NEO – *Neuroticism-Extraversion-Openness Inventory*
NET – Receptor de recaptação de noradrenalina
NIMH – *National Institute of Mental Health*
NMDA – N-metil D-aspartato
NNT – Número Necessário para tratar
NO – *Nitric oxide*
NOS – *Nitric oxide synthase*
NTRK2 - *Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2*
ODZ4 - *Teneurin-4*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBMC – *Peripheral blood mononuclear cell*
PGC-1α - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha gene*
PI3K - *Phosphatidylinositol-3-kinase*
PKA – Fosfoquinase A
PLC – Fosfolipase C
PP – Polaridade Predominante
PROGENE - Programa de Genética e Farmacogenética do IPq-HC-FMUSP

PSEN1 – *Presenilin 1*
PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*
RCTs – Estudos clínicos randomizados (*Randomized Clinical Trials*)
RNA - *Ribonucleic acid*
RNS – *Reactive nitrogen species*
RORA - *RAR-related orphan receptor-a gene*
ROS – *Reactive oxygen species*
SERT – Receptor de recaptação de serotonina
SESTD1 - *Spectrin domains 1*
SLC4A10 - *solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10*
SLC6 - *Solute Carrier Family 6*
SMIT - *Solute carrier family 5 member 3 (Sodium/Myo-Inositol Cotransporter)*
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP - *Single nucleotide polimorphism*
SORT – *Sortilin receptor*
STAT - *Signal transducer and activator of transcription family*
STEP-BD – *Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder*
TAB – Transtorno Afetivo Bipolar
TB – Transtorno Bipolar
TCF/LEF - *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*
TERC - *Telomerase RNA component*
TLR - *Toll-like receptor family*
TOC – Transtorno Obsessivo-compulsivo
TP – Transtorno de Pânico
TP53 – *Tumor protein 53*
TSH – Hormônio Estimulante da Tireóide
UBC – *Ubiquitin C*
YMRS - *Young Mania Rating Scale*

Lista de tabelas

Tabela 1. Genes/*Loci* e SNPs/InDel associados à resposta profilática ao lítio em estudos de genes candidatos e GWAS 80
Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos para ensaios de avaliação de comprimento telomérico. 104
Tabela 3. Desenho dos *primers* para pirossequenciamento 106
Tabela 4. Análise descritiva das variáveis clínicas qualitativas e associação com resposta na escala ALDA (NR = não respondedor; RP = respondedor parcial; R = respondedor) 113
Tabela 5. Características e distribuição de frequência dos alelos e genótipos para cada SNP investigado 120
Tabela 6. Associações entre alelos e genótipos de AKT1, MTOR e SLC1A2 e os sítios de metilação de BDNF e BCL2 124
Tabela 7. Resultados de análises de interações multivariadas entre SNPs.... 125

Lista de figuras

Figura 1. Vias de sinalização reguladas pela ação do lítio 69
Figura 2. Géis de agarose a 1,5% de parte das amostras utilizadas no presente projeto demonstrando uniformidade quanto a qualidade e integridade do DNA 102
Figura 3. Figura representativa de discriminação alélica para o rs334558 do gene GSK3B 103
Figura 4. Rede e subredes de genes estudados e suas relações topológicas. 110

Resumo

Michelon L. *Investigação da associação de variantes polimórficas, sítios de metilação e tamanho de telômeros com resposta a longo prazo de lítio em Transtorno Bipolar* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2019.

INTRODUÇÃO: Lítio é considerado tratamento de escolha para prevenção de recorrência de Transtorno Bipolar. Dado o potencial de comprometimento funcional trazido pela doença, dos potenciais efeitos adversos de longo tempo de uso e da ampla variabilidade da resposta terapêutica ao lítio, faz-se necessário melhorar a capacidade de definir os pacientes que se beneficiarão de seu uso. As características clínicas e bioquímicas não são suficientes para precisar grupos de resposta, o que aponta para marcadores genéticos como importantes candidatos preditores. OBJETIVOS: Procurou-se investigar o impacto da presença de algumas variações genéticas e suas possíveis interrelações na determinação de resposta clínica de longo prazo. MÉTODOS: Foram selecionados 213 portadores de Transtorno Bipolar tratados com lítio a provenientes de 3 instituições. Todos os pacientes foram avaliados retrospectivamente através dos registros médicos com finalidade de quantificar a resposta terapêutica usando escala específica (Escala de Alda). Foi extraído DNA de amostras de sangue periférico, o qual foi genotipado pela técnica de PCR em tempo real para variantes de genes associados ao mecanismo de ação intracelular do lítio (SLC1A2. AKT1, GSK3B, MTOR). O comprimento dos telômeros foi determinado através de PCR em tempo real e utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Análise de pirossequenciamento foi utilizada para quantificar a porcentagem de sítios de metilação específicos em região do promotor IV do gene BDNF e em região promotora do gene Bcl-2. RESULTADOS: A distribuição genotípica e alélica para as variantes rs4354668 (SLC1A2), rs1130214-rs2494732-rs3730358-rs2498786 (AKT1), rs1732170-rs334558-rs3755556 (GSK3B) e rs1883965-rs1034528-rs2295080 (MTOR) não diferiram entre os grupos de resposta. A taxa de metilação para os sítios cg05218375-cg23497217-posição 3 do BDNF e para os sítios cg03813215-posição 2-posição 3 do BCL2 não diferiu entre os grupos de reposta. O sítio de metilação 3 do BDNF mostrou-se associado à variante rs2498786 (0,019); o sítio cg23497217 mostrou-se associado à variante rs1034528 (p = 0,019); o sítio cg05218375 mostrou-se associado à variante rs4354668 (p = 0,042) e à variante rs1130214 (p = 0,042); o sítio cg23497217 e a posição 3 mostraram-se associadas à variante rs1034528 (p = 0,005 e p =0,047). Essas associações não se correlacionaram à resposta terapêutica. Entretanto a variante rs1130214 mostrou associação marginal com resposta (p = 0,056) na presença do alelo A e a taxa de metilação em cg05218375 se correlacionou com o modelo contínuo de resposta terapêutica (rho = 0,53). O tamanho do telômero não se associou à resposta ao lítio, mas apresentou diferença significativa na presença do alelo C da variante rs1034528 (p = 0,041). Análise de agrupamento e de redução de dimensionalidade não forneceram modelos preditivos de interação entre variantes, sítios de metilação e tamanho de telômero para resposta terapêutica ao lítio. CONCLUSÕES:

Embora se tenha obtido demonstração da associação entre algumas variantes testadas e alguns sítios de metilação, a interação entre elas não demonstrou correlação com a resposta farmacológica ao lítio. Não há dúvidas de que essa resposta é poligênica e em face de seus efeitos na fisiologia celular os genes envolvidos devem representar a rede de proteínas ligada à ação do lítio. Para este estudo foram escolhidos preferencialmente genes centrais dessas redes, potencialmente mais associados à predisposição para doença. De qualquer modo, a interação multissistêmica de diferentes características clínicas com múltiplas variantes genéticas e com perfil de metilação de sítios em promotores de genes responsáveis pela remodelação celular, o que contrapõe os efeitos da doença, parece ser o modelo mais completo na correlação entre fenótipos de resposta terapêutica de longo prazo e genética.

Descritores: Farmacogenética; Lítio; Transtorno Bipolar; Polimorfismo de Nucleotídeo Único; Metilação de DNA; Telômero

Summary

Michelon L. *Investigation of the association between polymorphic variants, methylation sites and telomere length and long-term lithium response in Bipolar Disorder* [Thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2019.

INTRODUCTION: Lithium is considered the treatment of choice for recurrence prevention of Bipolar Disorder. Given the potential for functional impairment brought on by the disorder, the potential long-term adverse effects and a broad variation in therapeutic response to lithium, it is necessary to improve the ability to define patients who will benefit from its use. Clinical and biochemical features are insufficient to characterize response groups, what points to genetic markers such as important predictors. OBJECTIVES: We sought to investigate the impact of the presence of some genetic variants and their possible interrelations in the determination of long-term treatment outcome. METHODS: We selected 213 patients suffering from bipolar disorder and treated with lithium from 3 medical institutions. All patients were retrospectively assessed through medical records to quantify lithium response using a specific scale (Alda Scale). DNA was extracted from peripheral blood samples, which were genotyped by the real-time PCR technique for variants of genes associated with the intracellular mechanisms of lithium action (SLC1A2, AKT1, GSK3B, MTOR). The telomere length was determined by real-time PCR using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Pyrosequencing analysis was used to quantify the percentage of specific methylation sites in the promoter IV region of the BDNF gene and in the promoter region of the Bcl-2 gene. RESULTS: The genotypic and allelic distribution for variants rs4354668 (SLC1A2), rs1130214-rs2494732-rs3730358-rs2498786 (AKT1), rs1732170-rs334558-rs3755556 (GSK3B) and rs1883965-rs1034528-rs2295080 (MTOR) did not differ between the response groups. The methylation rate for sites cg05218375-cg23497217-position 3 of the BDNF and for sites cG03813215-position 2-position 3 sites of the BCL2 did not differ between the response groups. The methylation site 3 of BDNF was shown to be associated with variant rs2498786 (0.019); site cg23497217 site associated with variant rs1034528 (p = 0.019); site cg05218375 was associated with variant rs4354668 (p = 0.042) and variant rs1130214 (p = 0.042); sites cg23497217 and position 3 were associated with variant rs1034528 (p = 0.005 and p = 0.047). These associations did not correlate with the therapeutic response. However, the rs1130214 variant showed a marginal association with response (p = 0.056) in the presence of the A allele and the methylation rate in cg05218375 correlated with the continuous model of therapeutic response (rho = 0.53). Telomere length was not associated with lithium response but showed a significant difference in the presence of the C allele for rs1034528 variant (p = 0.041). Clustering analysis and dimensionality reduction did not provide predictive models of interaction between variants, methylation sites and telomere length regarding therapeutic response to lithium. CONCLUSIONS: Although there was a demonstration of the association between some analysed variants and some methylation sites, the interaction between them did not show a correlation with the pharmacological

response to lithium. There is no doubt that this response is polygenic and from the point of view of its effects on cellular physiology, the genes involved in any test panel should represent the network of proteins linked to the action of lithium. For this study, central genes of this network, potentially more associated with predisposition to disease, were preferentially chosen. In any case, the multisystem interaction of different clinical characteristics with gene networks and their multiple variants with site-specific methylation rates in gene promoter regions, which are responsible for cell remodelling counteracting the effects of the disease, seems to be the most complete model in the correlation between phenotypes of long-term therapeutic response and genetics.

Descriptors: Pharmacogenetics; Lithium; Bipolar Disorder; Polymorphism, Single Nucleotide; DNA Methylation; Telomere

1 INTRODUÇÃO

Com o reconhecimento dos benefícios no tratamento do Transtorno Bipolar (TB) há 70 anos, o lítio se tornou medicação padrão nestes casos. Porém, a resposta no controle das ciclagens de humor está longe de ser ideal. Mesmo com a introdução de novas drogas ao arsenal terapêutico dos transtornos de humor, o ganho observado na prática clínica mantém-se insatisfatório. Identificar com boa confiabilidade indivíduos que se beneficiarão do tratamento com lítio ou com outras drogas é de extrema importância, tendo em vista os aspectos deletérios associados à manutenção e progressão dos sintomas afetivos bem como aos riscos envolvidos no tratamento a longo prazo.

O refinamento diagnóstico e a caracterização das variáveis clínicas associadas a resposta terapêutica ao lítio não se mostram suficientemente capazes de atender a demanda de personalização do tratamento. As influências genéticas ligadas à resposta terapêutica são inegáveis em diversos campos da medicina mas ainda representam uma fronteira a ser explorada na psiquiatria. Deste modo, identificar marcadores genéticos preditores de resposta ao lítio auxiliará significativamente no aumento da efetividade do tratamento farmacológico dos portadores de TB e possivelmente dos demais quadros ao longo do espectro de humor.

Estudos genéticos prévios não permitiram ainda estabelecer variantes preditivas, como já se esperava em virtude da complexa dinâmica do genoma. Ao considerar a necessidade de reconhecer os aspectos genéticos envolvidos com os efeitos de lítio, propõe-se ampliar a investigação iniciada a alguns anos

(Michelon et al., 2006) e estudar a interação entre variantes estruturais do genoma e mecanismos epigenéticos ligados a isso, bem como investigar a associação do comprimento de telômero com uso de lítio. Assim espera-se fornecer melhores dados para direcionar o tratamento de doenças com grande repercussão e comprometimento na funcionalidade e qualidade de vida como ocorre com o TB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transtorno Bipolar

Transtorno Afetivo Bipolar (TAB), ou apenas Transtorno Bipolar (TB), é uma doença complexa em todos os seus aspectos. Pode se mostrar heterogêneo, abrangendo um espectro de sintomas bastante amplo que se inicia em um pólo claramente depressivo, passa pelos estados mistos e termina em um pólo intensamente maníaco. Dentro desse *continuum* maníaco-depressivo, alguns subgrupos foram validados como subtipos diagnósticos. A mais recente versão do manual diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-5) discrimina 3 tipos. Há indivíduos que sofrem de oscilações claras entre os pólos depressivo e maníaco, os quais podem conter sintomas psicóticos em geral congruentes com o humor, e que apresentam remissão completa entre esses episódios. Estes representam a forma clássica da doença maníaco-depressiva que atualmente é referida como tipo I. Em torno de 20% desses pacientes apresentam um ciclo em que episódios diferentes se sucedem, formando um padrão de mania-depressão-intervalo (MDI) ou depressão-mania-intervalo (DMI). Muito próximos desse padrão de ciclagem estão os portadores de TB tipo II, os quais nunca apresentam quadros maníacos francos, mas sim hipomanias. Os bipolares tipo II podem eventualmente se tornar tipo I ao longo do tempo. Há ainda os ciclotímicos, que oscilam entre um quadro com sintomas depressivos insuficientes para caracterizar um episódio de Depressão Maior (DM) e um

quadro hipomaníaco em geral leve. Sua prevalência durante a vida é de 1,06% para o tipo I e de 1,57% para o tipo II (Clemente et al., 2015).

Os episódios de alterações de humor duram em média de três a seis meses (Angst; Preisig, 1995; Cusin, 2000; Frankle et al., 2002). Há diferença entre os subtipos de episódios e tempo de duração: nos estados mistos (média de 13,4 meses) e ciclagens rápidas o tempo para remissão tende a ser maior que em episódios puramente maníacos ou depressivos (Perugi et al., 1997).

Alguns indivíduos fogem um pouco desse perfil cíclico com episódios de polaridade definida. Nestes casos, observam-se interposição de sintomas de pólos opostos, o que caracteriza os episódios com aspectos mistos, ou simplesmente episódios ou estados mistos. Com a modificação realizada no DSM-5 a prevalência para um período de 10 anos de episódios de humor mistos aumentou de 6 para 20% em um grupo de pacientes com TB tipos I e II (Shim et al., 2015). Prevalências acima de 30% têm sido relatadas, especialmente em episódios depressivos e em mulheres (Miller et al., 2016). Outros pacientes apresentam ciclos muito frequentes, se sucedendo de modo rápido, inclusive em períodos de poucas horas, ou ainda apresentam ciclagem contínua, sem períodos intercríticos. Presença de 4 ou mais episódios de humor ao longo do período de 1 ano caracteriza aspectos de ciclagem rápida, com prevalência entre 26 e 43% ao longo da vida (Carvalho et al., 2014). Ciclagem contínua é observada em até 30% dos pacientes (Tondo et al., 2018).

Tendo sido observados desde as descrições iniciais, aparentemente essas apresentações clínicas têm aumentado de prevalência (Yutzy et al., 2012). Provavelmente isso reflete a mudança na compreensão dos quadros afetivos e

consequente alteração nos critérios diagnósticos. Não se pode excluir outros precipitadores, inclusive a disseminação do uso de antidepressivos. Essas caraterísticas se associam a pior resposta terapêutica e maior morbidade (Miller et al., 2016; Carvalho et al., 2014; Tondo et al., 2018). Etiologicamente as formas de apresentação podem representar subtipos da doença.

Manchia et al. (2017) confirmam achados de que o início do problema ocorre em média aos 26,7 anos de idade para o tipo I e 30,6 anos para tipo II, sendo que 20 a 30% dos pacientes experimentam um primeiro episódio afetivo antes dos 20 anos. Neste e em outros estudos, a distribuição da idade de início que melhor caracterizou a amostra é bimodal, distinguindo os tipos I e II e conferindo características clínicas distintas. Alguns estudos discriminam um terceiro pico de incidência com média de idade em torno de 47 anos. Maior proporção de pacientes com TB tipo I apresenta início precoce comparando-se com TB tipo II; abuso de álcool é mais frequente em início precoce para ambos os tipos; o curso DMI ocorre mais frequentemente no tipo II de início precoce e o MDI no tipo I de início precoce. Há importantes evidências de que TB de início precoce esteja associado a maior carga genética familial, a ciclagem rápida, a comorbidade com Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC) e Transtorno de Pânico (TP), e possivelmente com sintomas psicóticos (Geoffroy et al., 2013).

Em meta-análise conduzida por Joslyn et al. (2016) com total de 7370 indivíduos com TB (tipo I, II e não especificado), início precoce, estabelecido como abaixo de 20 anos, se associou a maior latência para início de tratamento (Hedges' g=0,39;95% CI 0,15-0,64, p = 0,001), maior gravidade de depressão (Hedges' g=0,42;95% CI 0,29-0,54; p < 0,001), maiores taxas de ansiedade (OR=1,72; 95% CI 1,34-2,19; p < 0,001), de Transtorno de Personalidade

(OR=2,34;95% CI 1,85-2,95; p < 0,001) e de uso de substâncias (OR=1,80;95% CI 1,39-2,35; p < 0,001). Embora não tenha aparecido uma associação nesta meta-análise com pior prognóstico, há uma relação em estudos de seguimento entre início precoce e significativa maior morbidade e mortalidade, além de comprometimento cognitivo maior (Duffy et al., 2017).

Por outro lado, estima-se que um início tardio, em que a primeira mania ou hipomania surge após 50 anos de idade, ocorra em 5 a 10% dos indivíduos com TB (Sajatovic et al., 2016). Mais raro e mais associado a alterações orgânicas, clinicamente o início tardio demonstra pior prognóstico, maior incidência de episódios depressivos e aspectos mistos (Shulman; Herrmann, 1999), podendo prenunciar quadros demenciais (Azorin et al., 2012). Por ser uma população com maior prevalência de comorbidades clínicas e neurodegenerativas, a compreensão do surgimento de TB nesta fase implica importantes considerações quanto ao mecanismo desencadeante e às estratégias terapêuticas utilizadas.

Em relação ao sexo e etnia parece não haver distinção da prevalência de TB, enquanto estado civil, as condições sócio-econômicas e culturais parecem influenciar a incidência da doença mas os estudos são incosistentes (Rowland; Marwaha, 2018). Diferentes meta-análises e revisões sistemáticas procuraram investigar fatores ambientais, psicológicos e clínicos relacionados ao risco de desenvolvimento de TB e recorrência de episódios afetivos. Insultos ao neurodesenvolvimento, como infecções e hipóxia podem conferir um risco maior, porém os achados mais importantes se referem a história de tratamento

abusivo na infância, que tem demonstrado ser fator significativo no surgimento e pior evolução da doença (Agnew-Blais; Danise, 2016; Aldinger; Schulze, 2017).

Os achados mais frequentes se relacionam a fatores genéticos, com herdabilidade de TB estimada em torno de 80%. Todavia, o impacto cumulativo de diversos alelos comuns com efeito pequeno consegue explicar apenas 38% da variância fenotípica (Lee et al., 2011).

O risco de recorrência após um primeiro episódio cresce substancialmente com o passar dos anos. Em importante estudo naturalístico do National Institute of Mental Health (NIMH), observou-se que em um ano houve taxa de recorrência para mania pura de 48% e em cinco anos de 81%; para aqueles com episódios mistos a taxa foi de 57% em um ano e 91% em cinco anos (Keller et al., 1993). Coryel et al. (1995) mostraram que em cinco anos, mais de 70% dos pacientes em remissão, sob litioterapia profilática, apresentaram recorrência dos sintomas. Gitlin et al. (2018) observaram que 73% dos pacientes tiveram um novo episódio em 4,3 anos de tratamento profilático, em média. Dos pacientes que não apresentaram recorrência, 46% mantiveram sintomatologia afetiva.

Revisões e estudos anteriores mostravam que a freqüência anual de episódios afetivos encontra-se entre 0,41 por ano (Marneros, 2001) e 0,54 por ano (Dunner et al., 1979) para TB tipo I. Após início da doença, os pacientes passam 19% de suas vidas em episódios afetivos num período de observação de 27 anos (Angst et al., 2003). Mais recentemente, Tondo et al. (2017) avaliaram uma coorte retrospectiva de pacientes com TB acompanhados em média por 16,7 anos e observaram que episódios depressivos duram 50% mais

que os maníacos/hipomaníacos, que episódios maníacos e depressivos apresentam taxas de recorrência aproximando-se de 1 episódio por ano para cada polaridade e 37% do tempo de acompanhamento foi caracterizado por episódios da doença. Casos em que sintomas psicóticos estavam presentes tiveram maior incidência de episódios maníacos, mas as taxas de recorrência foram maiores para os portadores de TB tipo II e aqueles com aspectos mistos.

Estudos naturalísticos mostram uma recorrência de 26,3% ao ano enquanto estudos controlados randomizados (RCT) mostram recorrência em média de 21,9% ao ano com tratamento farmacológico, e de 31,3% ao ano com placebo em revisão sistemática realizada por Vásquez e colaboradores (2015). A associação de antipsicótico ao tratamento favorece a prevenção de recorrência (15,8% [8,3–23,3] vs. 26,8% [22,1–31,5]/ano; t = 2,19; p = 0,04) em relação ao tratamento com lítio ou anticonvulsivantes. Um único estudo de curta duração mostrou superioridade de quetiapina em relação ao lítio em monterapia. Os antipsicóticos se sobressaem frente a placebo (RR = 0,56 [0,092–0,45], NNT = 4,3 [3,3–6,1]), seguidos por lítio (RR = 0,62 [0,42–0,91], NNT = 4,9 [3,1–11]) e lamotrigina (RR = 0,87 [0,73–1,0]; NNT = 13 [6,0–56,0]). Na avaliação dos resultados há que considerar que o tempo de seguimento foi relativamente curto, média de 2,1 anos (95%CI 1.9–2.2) para os estudos naturalísticos e de 1,9 anos (95%CI 1.7–2.0) para os RCTs.

A relação entre recorrência e eventos estressores é discutível dada a dificuldade de mensurá-los em relação ao impacto na vida do indivíduo, embora alguns achados apontem para uma associação entre alguns tipos de estressores e o desencadeamento de episódios afetivos. A relação causal pode se dever ao

sofrimento psicológico causado pelo evento ou pela modificação na rotina de vida com consequente ruptura de ciclos biológicos circadianos. As evidências sugerem que eventos estressores são mais impactantes no início da doença e não conferem suporte ao modelo de "*kindling*" de hipersensibilização neuronal (Bender; Alloy, 2011).

Torna-se cada vez mais consensual que o período intercrítico do TB não é tipicamente um intervalo livre de sintomas em grande parte dos casos e que a doença pode ter um caráter progressivo com desenvolvimento de refratariedade ao tratamento farmacológico. Dados obtidos a partir do estudo STEP-BD apontam a associação positiva entre episódios mais graves e piores funcionamento e qualidade de vida (Magalhães et al., 2012). Embora controversos e sujeitos a viés amostral, há alguns estudos mostrando a perda de eficácia de lítio e antipsicóticos à medida em que os episódios se sucedem, perda progressiva de substância cinzenta à medida em que há recorrência, prejuízo do funcionamento cognitivo associado à maior número de episódios, redução nos níveis séricos de marcadores imunológicos e fatores neurotróficos relacionados a proteção neuronal em pacientes com maior morbidade (Berk et al., 2017). Frente a estas observações, propostas de estadiamento da doença visam promover uma compreensão maior da sua evolução e das implicações em relação às estratégias de tratamento. Embora essa abordagem não seja adotada clinicamente de modo amplo, reconhece-se que existem pacientes cuja evolução é maligna, com grande comprometimento cognitivo e funcional a despeito de todos os esforços terapêuticos empreendidos.

2.2 Uso de lítio no transtorno bipolar

A primeira publicação sobre efeitos profiláticos de lítio foi feita em 1963 por G. Hartigan. Embora com deficiências metodológicas seguiram-se estudos controlados com placebo e de descontinuação. Os resultados mostravam que em média 30% dos pacientes sob litioterapia apresentavam recorrências em comparação com a média de 70% para aqueles usando placebo (Schou; Thompsen, 1976) apud Rybakowski (2018). Lítio foi aprovado para tratamento de mania aguda pelo FDA em 1970, mas apenas em 1974 o mesmo órgão chancelou seu uso a longo prazo para prevenção de mania, 25 anos após a publicação histórica de John Cade sobre efeito do lítio em pacientes diagnosticados com mania, esquizofrenia e melancolia.

Diversas revisões sistemáticas e meta-análises comprovaram seu papel relevante no tratamento de transtornos de humor. Dado seu amplo mecanismo de ação, a utilização em outros doenças psiquiátricas e neurodegenerativas também demonstra bons níveis de eficácia. De qualquer modo, lítio se consolidou como o estabilizador de humor por excelência, sendo primeira escolha para a manutenção do tratamento de TB em todos os *guidelines* e recomendações de *experts* (Hammett; Youssef, 2017).

Com a melhora no diagnóstico do TB devido a sistematização de critérios diagnósticos e reconhecimento de padrões diferentes da evolução da doença, um tratamento mais adequado tornou-se mais possível a seus portadores. Contudo, desproporcionalmente ao aumento dos casos diagnosticados, a prescrição de lítio manteve-se relativamente constante, enquanto os anticonvulsivantes, em especial os associados ao ácido valpróico e a lamotrigina,

bem como os antipsicóticos atípicos, cresceram enormemente.

Nas duas últimas décadas, lítio deixou de ser a primeira droga prescrita para TB nos EUA, sendo substituída pelos antipsicóticos atípicos (Kessing et al., 2016). O mesmo ocorreu em países europeus e asiáticos (Bellivier et al., 2014; Karanti et al., 2016; Song et al., 2016). Estudo feito no Brasil por Taveira (2007) mostrou que o lítio era na época a primeira escolha entre os psiquiatras que responderam a um questionário, sendo incluído em quase 80% das suas prescrições para pacientes bipolares. Cerca de 70% desses psiquiatras entretanto referiram necessidade de maiores informações sobre a medicação. Outro estudo realizado num município de Santa Catarina mostrou que entre o período de 2009 e 2011 o uso de lítio aumentou 50% enquanto o de ácido valpróico somado ao valproato aumentou 100% entre os usuários do sistema público de saúde (Gruber; Mazon, 2014). Resultados de outras localidades mostram tendência diferente, com aumento na dispensação de lítio ao longo dos anos e estabilidade na de ácido valpróico (Padilha et al., 2014). Esses dados devem ser tomados com cuidado devido ao potencial de viés de amostragem. As contradições observadas em nosso país podem ser em parte explicadas pelas diferenças regionais no acesso a saúde. Grandes centros urbanos concentram instituições de ensino e maior número de especialistas, potencialmente impactando o modo de tratamento.

A associação entre diferentes drogas estabilizadoras também aumentou nos últimos anos, chegando a 85% de prevalência para pelo menos duas drogas e 36% para associações complexas, definida como uso de 4 ou mais drogas

(Bellivier et al., 2014; Fornaro et al., 2016), apesar de seu benefício carecer de evidências (Bauer et al., 2018). Pacientes usando associações complexas tendem a ser mulheres com predomínio de episódios depressivos e transtornos de ansiedade tendem a ter histórico de tentativa de suicídio e Transtorno de Personalidade Borderline (Golden et al., 2017). Alguns traços de personalidade identificados pelo Inventário de Personalidade NEO, como menor abertura a experiência, menor extroversão e menor conscienciosidade se relacionam a polifarmácia complexa em TB (Sachs et al., 2014).

Observa-se também a tendência em substituir lítio por outros estabilizadores na população idosa com TB, e mesmo nesses casos a associação de diferentes drogas é a regra (Rej et al., 2017), a despeito das fortes evidências do efeito neuroprotetor da litioterapia, algo que parece ser independente da eficácia terapêutica observada nessa faixa etária (De Fazio et al., 2017).

Mesmo com a concordância observada na indicação para o lítio, a prática clínica portanto não observa consistentemente essas recomendações, e isto fica mais patente em relação à monitoração do nível sérico (litemia). Mesmo em países europeus onde o uso de *guidelines* é mais disseminado e a regulamentação da prática médica mais restritiva, a adequada monitoração sérica da litemia, bem como de marcadores do potencial tóxico sofre função renal e tireóide, atinge no máximo 75% do esperado (Golic et al., 2018; Nikolova et al., 2018). Do mesmo modo a despeito das recomendações, o uso de antidepressivos no TB mantém-se elevado.

Aparentemente, os cuidados na utilização de lítio desestimulam sua prescrição em favor de outras drogas com efeito estabilizador. A prescrição de

lítio tem reduzido nas duas últimas décadas em favor de anticonvulsivantes e antipsicóticos atípicos como fenômeno global. A relutância em seu uso deve-se em grande parte à associação com efeitos colaterais, dificuldade em monitorar níveis séricos e identificar níveis ideais para cada indivíduo e ao risco de desenvolvimento de hipotireoidismo, insuficiência renal e neurotoxicidade. Dificuldades particulares do sistema público de saúde no Brasil tornam a prescrição e monitoração ainda mais difíceis. Quando há acesso a especialista em saúde mental, as consultas médicas dificilmente são frequentes, não há abordagens psicoeducacionais satisfatórias que eduquem o paciente em relação à doença e aos cuidados com seu tratamento, as práticas clínicas não são uniformes e o acesso a exames confiáveis e rápidos é muito restrito.

Apesar disso, é inegável o benefício desta medicação. Considera-se que aproximadamente 1/3 dos portadores de TB recebendo lítio mantenham-se livres de episódios. As taxas de resposta diferem entre as populações estudadas e dependem fundamentalmente dos critérios adotados para defini-la. Resultados dos primeiros estudos controlados de eficácia mostravam taxas de resposta entre 70 a 80%. As décadas seguintes observaram uma queda nestas taxas. Maj et al. (1998) identificaram que 19,4% de sua amostra tratada em clínica especializada continuava em monoterapia com lítio e sem novos episódios afetivos após 5 anos de tratamento. Já Yazici et al. (2004) encontraram 60,3% dos pacientes em monoterapia livres de episódios após 3 anos de seguimento em clínica especializada. Importante notar que estes estudos se baseavam em definições de resposta diversas, embora basicamente consideravam hospitalização ou duração de episódios como marcadores de resposta terapêutica.

Ao final da década de 90 a distinção de um fenótipo de resposta excelente ganhou força entre os pesquisadores como um marcador de um subgrupo de pacientes com TB tipo I. Dentro desta perspectiva, Rybakowski et al. (2001) encontraram uma resposta excelente, definida como ausência de qualquer episódio, em 35% de um primeiro grupo de pacientes e em 27% de um segundo grupo, acompanhados ambos por 10 anos. Contudo, a definição de um fenótipo de resposta excelente persiste não resolvido. Kessing et al. (2011) avaliaram os registros de saúde nacionais dinamarqueses e encontraram uma taxa de resposta excelente, definida como monoterapia e ausência de hospitalização por episódio afetivo, para 9,9% (95% CI 7,9-9,9) em 5 anos e 5,4% (95% CI 4,4-6,3) em 10 anos de seguimento.

Na mais recente meta-análise sobre eficácia do lítio envolvendo 1580 participantes, Severus et al. (2014) demonstraram sua superioridade em relação a placebo na prevenção de qualquer tipo de episódio (RR 0,66; 95% CI 0,53-0,82; $p < 0,001$), na prevenção de episódios maníacos/hipomaníacos (RR 0,52; 95% CI 0,38- 0,7; $p < 0,001$) e de episódios depressivos na dependência do tipo de análise realizada (*fixed effect* RR 0,73, 95% CI 0,60-0,88; $p < 0,001$). Em um subgrupo de 1305 indivíduos foi comparado eficácia com anticonvulsivantes, e lítio mostrou superioridade apenas na prevenção de mania (RR 0,66; 95% CI 0,44-1,00; $p = 0,01$). Esses dados corroboram revisões sistemáticas e meta-análise anteriores. Meta-análise em rede, método que possibilita comparar 3 ou mais intervenções terapêuticas, incluindo mais de 6800 participantes mostrou que a maioria das drogas são superiores a placebo na prevenção de recorrência em TB, embora nenhuma seja superior ao lítio na prevenção tanto de episódios maníacos como depressivos (Miura et al., 2014). Kessing et al. (2018) mostraram

que lítio em monoterapia é superior na manutenção do TB comparado com qualquer outro estabilizador do humor (valproato, lamotrigina, olanzapina e quetiapina) em monoterapia. A maioria das combinações de lítio com outro estabilizador de humor não se mostraram superior. Quetiapina em monoterapia mostrou-se superior à combinação de lítio e valproato para prevenção de episódios maníacos e depressivos em meta-análise recente (Lindström et al., 2017), embora estudo de revisão anterior não tenha observado superioridade entre lítio e quetiapina (Ketter et al., 2016). Estudo posterior de efetividade de mundo real, considerando todos os psicotrópicos prescritos numa coorte de segmento médio de 7,2 anos e com 18000 pacientes, tomando como parâmetro o risco de hospitalização em TB, mostrou efetividade modesta para quetiapina, sendo superada por antipsicóticos de depósito, enquanto lítio mostrou-se o psicotrópico mais eficaz na redução de risco de hospitalização por qualquer causa (Lähteenvuo et al, 2018).

Questionamentos a respeito da perda de eficácia ao longo do tempo surgiram a partir da constatação de que as taxas de resposta apresentadas nos estudos a partir da década de 90 mostraram-se mais baixas que as iniciais. Embora em alguns casos ocorra um possível efeito *kindling*, e haja uma progressão de prejuízos funcionais dentro de um modelo de estadiamento da doença, as evidências maiores sugerem preservação do poder profilático de longo prazo (Berghöfer et al., 2013). Alguns autores também descreveram desenvolvimento de refratariedade ao lítio com reinstituição após sua descontinuação. Esse fenômeno parece ser infrequente e não comprometer as taxas de resposta (de Vries et al., 2013). A descontinuação de litioterapia, principalmente se abrupta apresenta risco de recorrência imediata de sintomas

aumentada (Baldessarini et al., 2006). Na prática clínica, diversos fatores podem levar a descontinuação, como gravidez, abandono de tratamento, efeitos colaterais intoleráveis, intoxicação. Argumento contrário ao desenvolvimento de refratariedade provém do subgrupo de pacientes com TB caracterizados como excelentes respondedores, que atingem a estabilização e não apresentam efeito rebote quando lítio é descontinuado durante período de remissão completa assim como o retorno ao uso reestabelece o mesmo padrão de resposta prévio (Grof, 2010). Recomenda-se que se for decidido por descontinuar lítio, deve-se fazer muito gradualmente, uma vez que do contrário o risco de recorrência é elevado, principalmente para mania (Baldessarini et al., 2006).

Lítio também tem demonstrado efeito preventivo sobre tentativas de suicídio. Embora bastante divergentes entre os estudos, em portadores de TB as taxas de tentativa de suicídio são de 6 a 15 vezes menores nos usuários de lítio, com índices próximos ao da população geral (Lewitzka et al., 2015), e a morte por suicídio é reduzida entre 10 a 20% (Benard et al., 2016). Este efeito parece ser independente da doença, uma vez que populações que usam água com maior concentração de lítio apresentam menores índices de suicídio (Kessing et al., 2017) e eventos relacionados a agressividade (Goldstein; Mascitelli, 2016). A eficácia da ação sobre comportamento suicida tem se mostrado consistente entre os estudos. Cipriani et al. (2013) mostraram que lítio é superior a placebo na redução de mortes por suicídio em portadores de TB (OR 0,13; 95% CI 0,03-0,66; p = 0,01) e DM (OR 0,36; 95% CI 0.13-0.98; p = 0,02). Lítio não foi superior a placebo no controle de comportamento de automutilação, mas superou carbamazepina (OR 0,14; 95% CI 0.02-0.83; p = 0,03). Nova revisão da literatura por esse grupo confirma as evidências prévias

de superioridade dessa droga (Smith; Cipriani, 2017).

Os efeitos do lítio sobre agressividade e impulsividade, traços comumente exacerbados no TB, podem ser os responsáveis pela redução nas taxas de suicídio nesta população. Ações moleculares específicas ligadas à cognição e à inibição da resposta inflamatória em SNC podem ser as responsáveis por essa característica. Interessantemente, é raro que o lítio seja usado como instrumento nas tentativas de suicídio e mais raro ainda que responda por casos fatais (Schaffer et al., 2017), talvez porque seus usuários estejam menos propensos a esse comportamento.

2.2.1 Variáveis laboratoriais e clínicas associadas à resposta ao lítio

Tendo em vista a heterogeneidade das apresentações do TB, caracterizar aqueles pacientes com maior potencial de resposta é uma necessidade. Variáveis clínicas, marcadores bioquímicos e fisiológicos foram explorados extensamente com esse propósito.

Capacidade de transporte em membranas de hemácias, relação da concentração entre plasma e hemácias, ritmo de excreção urinária, atividade de monoamino-oxidases plaquetárias, concentração de cálcio e magnésio séricos, antígenos leucocitários, concentração de monoaminas em líquido cefalorraquidiano (LCR) e urina (Rybakowski et al., 1989; Ikeda; Kato, 2003; Layden et al., 2004) trouxeram informações que orientaram a pesquisa sobre os mecanismos de ação do lítio mas pouco contribuíram para predição de resposta

terapêutica. A quase totalidade dos estudos tem pequeno número de casos e não considera critérios mais estritos de resposta, como os representados pelo fenótipo de excelentes respondedores.

Dentre os achados, mostra-se interessante a presença de maiores níveis séricos de TSH se relacionando com maior risco de recaída depressiva de modo significativos (Frye et al., 2009) enquanto nível sérico de T4 livre foi associado a maior frequência de episódios afetivos e maior gravidade de depressão (Frye et al., 1999). A associação entre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com transtornos de humor tem sido reconhecida há tempos, mas somente mais recentemente os mecanismos responsáveis por essa conexão têm sido desvendados.

Estudos mais recentes procuraram avaliar atividade enzimática e concentração de elementos associados a atividade da doença e propostos como parte do mecanismo de ação dos estabilizadores de humor. Melhora clínica não se associou ao aumento da fosforilação de GSK3B (Loch et al., 2015), tampouco a fosforilação de CREB (Alda et al., 2013). Níveis de leptina antes do início de lítio em monoterapia foram maiores em pacientes que atingiram remissão no período de 6 semanas de tratamento (Soeiro-de-Souza et al., 2014). Ambos os estudos utilizaram bipolares em episódio depressivo. Atividade da telomerase se relacionou negativamente com melhora da depressão após 6 semanas de tratamento com lítio mas não se associou significativamente com a resposta medida através de escalas de mania e depressão (Soeiro-de-Souza et al., 2014). Níveis plasmáticos de TNF, TGF-B1, IL-23 e IL-17 reduziram significativamente em pacientes em mania que responderam agudamente ao lítio (Loch et al., 2015). Reconhecidamente existem alterações na concentração de proteínas

inflamatórias de modo relacionado a ocorrência do episódio de humor e em decorrência do uso da medicação, o que gera potencial de confusão na associação de alterações dos níveis séricos desses marcadores com resposta farmacológica. Além disso, os mecanismos pelos quais o lítio interfere na expressão protéica agudamente em tecidos periféricos não são necessariamente relacionadas ao mecanismo molecular de estabilização de humor a longo prazo. Pesa negativamente a curta duração de exposição ao lítio avaliando biomarcadores periféricos e predição de resposta clínica na maioria dos estudos, os quais portanto necessitam ser continuados a longo prazo para melhor compreensão do efeito dos achados. Há bastante consistência nas pesquisas que apontam para o aumento da expressão de BDNF, o qual se relaciona a efeito de longo prazo e neuroplasticidade em diferentes quadros neuropsiquiátricos. Respondedores a lítio em mania tem níveis plasmático de BDNF aumentado de modo mais pronunciado em relação aos não respondedores, porém de modo não significativo (de Souza et al., 2011).

Avaliação neurofisiológica através de estudo de potenciais evocados e alterações no padrão de oscilações eletrofisiológicas corticais foram amplamente investigadas com relação ao efeito do lítio na década de 80. Algumas características, como atividade evocada no córtex auditivo primário e aumento de oscilações de baixa frequência, parecem se relacionar com resposta ao lítio e merecem investigação aprofundada com as novas tecnologias de maior precisão (Park; Lee, 2013; Atagün et al., 2016).

Estudos estruturais de neuroimagem tem consistentemente demonstrado aumento de volume de substância cinzenta em áreas importantes para regulação do humor, inclusive longitudinalmente para córtex pré-frontal,

especialmente devido ao potencial efeito neuroprotetor e neurotrófico do lítio em hipocampo, fato geralmente não observado para anticonvulsivantes e antipsicóticos (Moore et al., 2009; Hafeman et al., 2012; Houenou et al., 2017).

Clinicamente por outro lado há uma consistência em relação a um perfil relacionado a boa resposta ao lítio. Excelentes respondedores apresentam uma forma mais clássica da doença, com um curso com episódios distintos entre períodos de remissão, com baixa comorbidade psiquiátrica e frequentemente com história familiar positiva para TB. Alterações nas funções vitais, como sono, apetite e libido, acompanhando as flutuações de humor ocorrem mais frequentemente nesta população. As manifestações psicóticas são congruentes com o humor.

Análises sistemáticas e meta-análises mostram que algumas características clínicas se relacionam mais fortemente com o efeito profilático. Kleindienst et al. (2005) avaliaram 42 fatores preditivos de resposta considerados em 43 estudos e encontraram que episódios com padrão de evolução em que mania precede depressão (MDI) ($r = 0,20$; 95% CI 0,09-0,31; $p < 0,001$) e início mais tardio da doença ($r = 0,11$; 95% CI 0,04-0,19; $p = 0,003$) se relacionam a boa resposta, enquanto episódios em que depressão precede mania (DMI) ($r = -0,12$; 95% CI -0,21 - -0.02; $p = 0,02$), grande número de hospitalizações prévias ($r = -0,38$; 95% CI 0,41-0,27; $p < 0,001$) e ciclagem contínua ($r = -0,21$; 95% CI -0,31- -0,12; $p < 0,001$) se relacionam com pior resposta. Outras variáveis se mostraram significativamente associadas a resposta, embora com menor robustez, como presença de episódios isolados e boa resposta, e sintomas psicóticos incongruentes com o humor em episódios prévios, alta frequência de episódios, longo intervalo entre primeiro e segundo episódios e comorbidade

com transtorno de personalidade com má resposta. O grande problema que limita a confiabilidade desses resultados está na grande heterogeneidade dos estudos disponíveis, essencialmente determinada pela definição de TB e critérios de resposta terapêutica, tempo de seguimento e tamanho das amostras.

O risco de recorrência claramente aumenta com presença de sintomas residuais entre episódios, sintomas psicóticos incongruentes com humor, presença de ciclagem rápida e história familiar positiva de TB de acordo com outro estudo utilizando banco de dados de bons respondedores em múltiplos centros (Pfennig et al., 2008). A interdependência das variáveis foi considerável e a qualidade da remissão respondeu por maior parte da pequena proporção da variância observada. A mesma população mostrou que a resposta ao lítio é sustentada ao longo do tempo, independente da presença de aspectos típicos ou atípicos (Berghöefer et al., 2008). Estudos buscando avaliar a associação de temperamentos com os transtornos de humor mostram uma associação de temperamento hipertímico com maior eficácia ao lítio (Rybakovski et al., 2013).

Sintomas psicóticos, presentes em cerca de metade de pacientes bipolares em algum episódio, desfavorecem uma boa resposta (Pfennig et al., 2010; Silva et al., 2016), assim como história de estados mistos (Backlund et al., 2009) e presença de sintomas atípicos em episódios depressivos (Ahn et al., 2017). Estudo brasileiro recente utilizando escala de avaliação retrospectiva criada para quantificar resposta profilática ao lítio, mostrou resultados similares e revelou história de uso de tabaco se correlacionando positivamente com resposta (Silva et al., 2016) ao contrário do apontado por outros grupos de pesquisa, que mostram uma tendência ao agravamento do curso e associação com comportamento suicida (Thomson et al., 2015). Essa correlação pode se

dever a associação frequente de tabaco a outras drogas principalmente em adolescentes (Heffner et al., 2012).

A prevalência durante a vida de uso de substâncias em TB é elevada, em torno de 33,4% (Hunt et al., 2016), tanto para substâncias ilícitas (OR 4,96; 95% CI 3,98-6,17; p < 0,001) como para álcool (OR 4,09; 95% CI 3,37-4,96; p < 0,001) e tabaco (OR 3,6; 95% CI 3,30-3,80; ; p < 0,001) (Jackson et al., 2015). De modo geral, abuso de substâncias como *cannabis*, álcool, cocaína, é fator complicador do curso da doença, associando-se à idade de início precoce e comportamento suicida (Albanese; Piers, 2004; Oquendo et al., 2010; Leite et al., 2015). O uso de drogas nos portadores de TB parece ser bidirecional, com influências mútuas no desenvolvimento e evolução das duas comorbidades. A ação central dessas substâncias envolve receptores amplamente relacionados a regulação do humor, mecanismos de neuroplasticidade, cognição, todos de alguma forma interconectados à fisiopatologia das doenças mentais e efeitos de psicotrópicos.

Sugere-se que a polaridade predominante (PP) tenha um impacto no curso do TB. Cerca de 50% dos pacientes apresentam uma polaridade predominante, ou seja, uma polaridade pelo menos 2 vezes mais frequentes do que a polaridade oposta, e isto se associa a características clínicas diferentes. A PP depressiva tem se associado consistentemente com episódio inicial depressivo, maior latência de diagnóstico e maiores taxas de comportamento suicida. Já a PP maníaca se associa com idade mais precoce de início, um primeiro episódio maníaco/psicótico e maiores taxas de abuso de substâncias (Carvalho et al., 2014). A polaridade predominante no curso da doença portanto é um modo de caracterizar a evolução de subgrupos de pacientes. Isto permite

gerar um índice representando a razão entre número necessário para tratar (NNT) para prevenção de depressão e o número necessário para tratar para prevenção de mania para cada psicofármaco, indicando seu potencial de eficácia no controle de determinado tipo de episódio. Observam-se índices de polaridade (NNT depressão/NNT mania) para lítio de 1,4, para quetiapina 1,14, para lamotrigina 0,4, o que indica certo equilíbrio de efeito para os dois primeiros entre eficácia para depressão e mania, mas com tendência maior para mania, e indicando maior eficácia da lamotrigina para depressão (Popovic et al., 2014). Essa abordagem parece ser interessante para comparar perfil preferencial de ação das drogas, porém sua aplicação na decisão clínica é questionável.

Há uma divergência quanto a associação de melhor resposta com a polaridade do episódio no início do tratamento, com alguns estudos indicando associação com depressão e outros com mania. Contudo, lítio tende a favorecer a prevenção na recorrência de episódios maníacos em relação aos do pólo depressivo (Geddes et al., 2004). Apenas recentemente demostrou-se resultados sólidos na eficácia do lítio em prevenir episódios depressivos (Weissler et al., 2011). Em concordância com essas observações, há maior associação com boa resposta quando lítio é iniciado após o primeiro episódio maníaco logo no início da doença (Post, 2018; Kessing et al., 2014), o que se relaciona com menor redução volumétrica de substância branca comparado com quetiapina (Berk et al., 2017). Coortes anteriores foram divergentes em seus resultados em relação a latência para início de lítio após o primeiro episódio de humor (Baldessarini et al., 2003; Baethge et al., 2003).

Alguns aspectos tem se mostrado conflitantes em sua associação com resposta em TB. Aparentemente portadores de TB tipo II respondem menos a

lítio; mulheres tendem a apresentar mais frequentemente TB tipo II e ciclagem rápida, mas se assemelham aos homens nas taxas de resposta ao lítio; presença de comorbidades clínicas se associaram a menor resposta; da mesma forma comorbidades com transtornos ansiosos se relacionam a pior curso da doença, com maior incidência de pensamentos suicidas e tentativas de suicídio. Uma das questões influenciando os achados diz respeito a quanto a interdependência dessas variáveis contribui na correlação individual entre cada uma e a eficácia do tratamento.

Pacientes sob risco de suicídio parecem corresponder a um subgrupo de melhor resposta profilática, de modo independente do perfil clássico, dentre os portadores de TB. Aparentemente contraditório, o risco de comportamento auto-agressivo é maior em estados mistos e manias disfóricas, tipos clínicos menos associados a resposta ao lítio (Tondo; Baldessarine, 2018). Se esses pacientes não se caracterizam como excelentes respondedores em termos globais, podem ser considerados como respondedores a aspectos específicos associados a doença. A presença de subgrupos clínicos encontrados em análise de agrupamento (Schaffer et al., 2014) e de expressão gênica (Lutz et al., 2017; Strawbridge et al., 2019) em pacientes que cometeram suicídio sugere que possam de fato representar uma subpopulação dentro do TB.

2.2.2 O problema da aderência sobre eficácia ao tratamento

Manter a aderência dos pacientes ao uso contínuo e em doses adequadas de medicações requer uma forte aliança terapêutica, constante atenção ao curso individual da doença e educação continuada sobre os riscos associados a descontinuação. Em psiquiatria, estabelecer aliança terapêutica é fundamental para manter aderência à prescrição. Segundo a OMS 50% dos indivíduos com doença crônica não seguem o tratamento conforme recomendações médicas. A OMS define não aderência como uso de medicação em desacordo com as recomendações do profissional de saúde. Alternativamente, alguns autores definem a não aderência como a ausência de tomada de 20% ou mais da medicação prescrita. Estimativas de não aderência em TB, independente da definição utilizada, varia entre 20 e 60%. Col et al. (2014) avaliaram a aderência de portadores de TB em remissão que se voluntariaram a preencher escala específica e encontrou que 42,3% dos pacientes não eram aderentes, prevalência em concordância com a maioria dos estudos.

No caso do lítio a dosagem sérica é uma forma objetiva de avaliação. É frequente a ocorrência de valores conflitivos dependendo do laboratório em que se realiza o exame. Confrontado com a narrativa dos pacientes prefere-se dar crédito aos pacientes, mesmo porque elevações na posologia baseadas somente no resultado do exame, comumente questionável em nosso meio, pode levar a intoxicação. Mesmo realizando medidas seriadas, a variabilidade dos resultados é grande e depende de inúmeros fatores biológicos, como por exemplo hidratação, medicações concomitantes, tempo da última ingestão do

remédio, quantidade de sódio na alimentação. Alguns pacientes com efeitos colaterais desconfortáveis e que procuram manter um estado de ativação hipomaníaco tendem a usar a dose prescrita alguns dias antes de realizarem as dosagens e após fazê-la reduzem novamente a dose. A percepção da pouca confiabilidade na mensuração laboratorial e nos relatos dos pacientes, dado a alta prevalência de má aderência, desfavorece a manutenção do lítio em doses terapêuticas e em monoterapia. Frente a dosagens teoricamente adequadas e presença de sintomas é clara a tendência dos clínicos em associar outras medicações imediatamente, mesmo após poucas semanas da introdução da litioterapia, conforme observação extensiva dos prontuários médicos.

Ampla revisão realizada por Levin et al. (2016) indica várias características sociodemográficas associadas ao risco de má aderência, como idade inferior a 40 anos, morar sozinho, grupos sociais minoritários ou não ser branco, crenças culturais e religiosas que negam existência de doenças mentais. A relação de aderência com sexo ainda não está estabelecida, uma vez que os estudos não mostram consistência nos resultados. Em sua grande maioria, contudo, os estudos revisados apresentam mais mulheres em suas casuísticas, o que sugere que sejam pelo menos mais dispostas ao seguimento e abordagens terapêuticas que os homens mas tendem a aparecer como menos aderentes. Uso de substâncias ilícitas, comorbidades clínicas, sintomas psicóticos, presença de ciclagem rápida, início precoce, transtorno de personalidade e transtornos ansiosos se associam a falha na tomada de medicação no estudo STEP-BD (Perlis et al., 2010), assim como esquemas farmacológicos complexos com maior número de medicações (Greene et al., 2018). As medicações antipsicóticas de segunda geração se associam a melhor tolerabilidade e

aderência, bem como uso de estabilizador de humor e medicação anticolinérgica.

Pacientes com prejuízos cognitivos associados a inteligência, memória de trabalho, memória prospectiva e funções executivas mostram-se menos aderentes. Um estudo em particular demonstrou que metade da variância para má aderência pode ser explicada pela combinação de prejuízos na percepção da gravidade da doença e dos benefícios do tratamento (Averous et al., 2018).

Má aderência está claramente associada a piora no curso da doença, com maiores índices de recorrência maníaca e depressiva e hospitalizações. Mesmo aderência parcial, resultando em concentrações subterapêuticas da medicação, mostram taxas de hospitalização em 18 meses de 81,2% comparado a 9,7% para aderência completa (Scott; Pope, 2002). Comportamento suicida, uso mais frequente de serviços médicos, maior mortalidade e pior desempenho social e ocupacional foram encontrados em pacientes pouco aderentes ao tratamento (Hung et al., 2011).

Os aspectos associados especificamente ao lítio se relacionam a tolerabilidade dos efeitos colaterais. Há indicações de que o uso inadequado depende mais do medo dos efeitos adversos do que propriamente de desconforto com uso dessa medicação. Efeitos colaterais estão presentes em até 90% dos usuários de lítio, sendo os mais frequentemente relatados náusea, diarréia, poliúria e polidipsia, tremor, ganho de peso, prejuízo cognitivo, disfunção sexual e alterações dermatológicas (Gitlin, 2016). Psoríase e acne são desencadeadas ou pioradas pelo lítio e em alguns casos podem requerer a suspensão da medicação.

Uso prolongado se associa a aumento gradual de creatinina e redução de seu *clearance* em 30% dos pacientes ao longo de décadas de uso (Aiff et al., 2015). *Diabetes insipidus* também pode decorrer dos efeitos sobre inibição de vasopressina e pode ser controlado adequadamente na maioria das vezes sem repercussões importantes. Hipotireoidismo clínico ou subclínico tem prevalência em torno de 20%, com risco maior na presença de anticorpos antitireoideanos, sexo feminino, idosos e história familiar positiva (Kibiridge et al., 2013). Hiperparatireoidismo mostra-se frequente, embora com repercussões menores, e decorre essencialmente do aumento da reabsorção de cálcio pelos rins (Shapiro; Davis, 2015).

Embora a toxicidade de lítio possa ocorrer com níveis abaixo do terapêutico, níveis acima de 1,5mEqL se associam a sintomas moderados a graves de intoxicação. Incidências de intoxicação apontam para 1 evento a cada 100 pacientes tratados por ano (Baird-Gunning et al., 2017). A população idosa está mais propensa em virtude de menor taxa de filtração glomerular e potencial interação medicamentosa. Contudo, não está claro se manutenção de níveis elevados de litemia e episódios de intoxicação impõem prejuízo maior para função renal do que níveis continuamente mais baixos. Em casos de intoxicação, a mortalidade é baixa, em torno de 0,2%, e sequelas neurológicas irreversíveis são raras, como disfunção cerebelar, disfunção do tronco encefálico e discinesia tardia (Gitlin, 2016; Baird-Gunning et al., 2017).

Problemas na aderência ao tratamento podem confundir a avaliação de eficácia. O adequado uso da medicação pode ser influenciado por questões cognitivas, sintomas residuais, intolerância a efeitos colaterais, uso de drogas e

diversos aspectos de personalidade, sociais e econômicos. Ressalta-se que algumas queixas atribuídas a efeitos colaterais podem se dever a sintomas da doença, principalmente as relacionadas à cognição e lentificação psicomotora, fraqueza, fadiga e sonolência.

2.3 Fenótipo de resposta ao lítio

A resposta ao tratamento farmacológico é um construto complexo que pressupõe julgamento sobre adequação do esquema proposto, sua tolerabilidade, manutenção da eficácia ao longo do tempo de evolução da doença. No contexto da prática psiquiátrica a definição de resposta sofre com a heterogeneidade dos fenótipos e com a subjetividade associada ao fenômeno psíquico (Pacchiarotti et al., 2009; Leucht et al., 2012).

A eficácia terapêutica em psiquiatria pode ser avaliada clinicamente através da gradual melhora do quadro clínico. O objetivo final é a remissão total dos sintomas. De modo geral os transtornos psiquiátricos têm baixas taxas de remissão sustentada ao longo do tempo, o que reflete as particularidades das doenças complexas, como a cronicidade, a multicausalidade, a ocorrência de comorbidades e susceptibilidade a eventos ambientais. Outro fator relevante na qualificação de reposta no tratamento dos transtornos mentais é a ciclicidade, cuja interrupção deve ser o objetivo primordial após a remissão dos sintomas iniciais.

TB tem como característica fundamental a recorrência de episódios afetivos agudos. Pode-se pensar no seu tratamento como intervenções para controle do quadro agudo e/ou para controle de longo prazo. As definições de resposta farmacológica aguda em geral são bem estabelecidas e confiavelmente quantificadas. Contudo, definir resposta profilática tem sido objeto de debate e requer uma perspectiva diferente de avaliação em que se considere inúmeras variáveis ao longo do tempo. Avaliar eficácia na prevenção de recaídas de um episódio requer acompanhamento de duração de pelo menos 4 a 6 meses, tempo para remissão de episódios maníacos e depressivos se não tratados.

Profilaxia por sua vez requer um tempo de seguimento maior, dada a diversidade individual apresentada na história natural da doença, importante limitação na condução de estudos clínicos orientados para eficácia terapêutica. É consensual que a morbidade pode ser elevada no primeiro ano sob litioterapia em pacientes que apresentam resposta completa a longo prazo (Alda, 2015). Conceituar adequadamente profilaxia em TB tem sido um grande desafio, e mais complexo ainda quantificar eficácia a longo prazo.

Em geral, os estudos relacionam resposta positiva com redução de recorrência de episódios ou redução na duração dos episódios, o que requer um parâmetro de frequência e duração previamente à exposição à droga avaliada. Mais recentemente, com a introdução da percepção de estadiamento da doença, avaliação de funcionalidade, qualidade de vida e comprometimento de funções neuropsicológicas tem sido consideradas na identificação de eficácia terapêutica de longo prazo (Chen et al., 2016). Outro aspecto a ser considerado é a manutenção da eficácia ao longo do tempo, o que envolve características

próprias do curso irregular da doença e possível adaptação e desenvolvimento de tolerância aos efeitos positivos das medicações. Refratariedade ao tratamento é igualmente de caracterização complexa e definição incerta. Evolução dos conceitos e critérios diagnósticos impuseram a necessidade de considerar a presença de estados mistos e ciclagem rápida como aspectos evolutivos com repercussões diferenciadas sobre a morbidade e resposta ao tratamento.

A partir destas dificuldades e de observações clínicas naturalísticas de longa duração, um subgrupo de portadores de TB parece se distinguir dos demais em relação ao benefício do uso de lítio. São os respondedores excelentes, fenótipo representado por pacientes com inequívoca interrupção do curso ou marcante redução da morbidade da doença após início de litioterapia (Alda, 2017). Do ponto de vista hipocrático seriam considerados “curados”, quando a doença é tratada, e não apenas os sintomas.

2.3.1 Mensuração da resposta profilática ao lítio

Avaliar eficácia de longo prazo na prevenção de recorrência em uma doença com curso natural extremamente variável impõe desafios. A heterogeneidade intra e interindivíduos pode ser muito ampla ao longo do curso da doença, de modo que a determinação do fenótipo de resposta deve considerar o maior número possível de variáveis potencialmente associadas. Diferentemente de uma avaliação prospectiva, as variáveis disponíveis são limitadas às ocorrências registradas ou à lembrança dos indivíduos.

Questionários e escalas auxiliam na compilação de dados mais objetivos correndo o risco de não garantir a contribuição da impressão clínica baseada na experiência intensiva com diferentes padrões de evolução e sua relação com os tratamentos farmacológicos realizados.

Diversas escalas foram desenvolvidas e são constantemente aprimoradas para mensurar intensidade de sintomas ao longo do tratamento de modo mais objetivo e são fundamentais em seguimentos prospectivos. Classicamente, escalas como HAM-D (*Hamilton Rating Scale for Depression*), YMRS (*Young Mania Rating Scale*) e BPRS (*Brief Psychiatric Rating Scale*) aplicadas pontualmente ou em série fornecem parâmetros de efeito num corte transversal ou longitudinal respectivamente. Outros instrumentos são amplamente utilizados como medidas clínicas mais dependentes da observação médica, como CGI (*Clinical Global Impression Scale*), com uma versão para TB (CGI-BD), tentando diferenciar sintomas de efeitos colaterais decorrentes do esquema medicamentoso e GAF (*Global Assessment of Functioning*). Embora as primeiras devam ser realizadas prospectivamente pois requerem busca ativa pelos sintomas, a CGI pode ser aplicada retrospectivamente desde que se tenha informação adequada sobre o funcionamento do paciente no período de interesse. Estudos clínicos de curta duração se amparam nesses instrumentos para mensurar resposta com grande margem de confiabilidade.

De modo diverso, em estudos de profilaxia, o tempo de observação precisa ser longo, uma vez que a doença pode apresentar ciclos duradouros de remissão espontânea; e ausência de sintomas não significaria resposta adequada nesse caso. Tendo em vista a evolução natural dos transtornos de humor,

período de observação abaixo de 2 anos não traz informações significativas no poder de profilaxia de uma droga. Estudos clínicos de longa duração são onerosos e muitas vezes inviáveis. Assim, necessita-se de modelos objetivos de avaliação retrospectiva. Como condição para tanto é preciso ter uma boa fonte de informação registrada, como prontuários adequadamente preenchidos que descrevam presença de sintomas, sua intensidade e mudanças ao longo do tempo para permitir relacioná-las com os ajustes na terapêutica, que descrevam aspecto da funcionalidade e qualidade de vida, que apontem efeitos colaterais e que os possam diferenciar de sintomas residuais. Do contrário, ao se basear em parâmetros subjetivos tanto do paciente quanto de seu médico a chance de erros de avaliação aumenta muito, além de se incorrer em interpretações e memória prévias falhas.

Paralelamente, avaliações laboratoriais sequenciadas com dosagens séricas frequentes de laboratórios confiáveis são fundamentais para evitar interpretação falsa em relação à eficácia do tratamento. A aderência deve ser checada não apenas através dos exames, pois uso contínuo de medicação é um obstáculo em especial neste grupo de pacientes. As informações podem ser traduzidas num esquema visual como em um “afetivograma”, de fácil e rápida avaliação e que pode ser feito em conjunto com o paciente, inclusive melhorando o engajamento na busca pelo melhor esquema terapêutico. De todo modo, as limitações de avaliação retrospectiva são inerentes ao modelo e à complexidade do TB.

Dentro desta perspectiva, a partir da implementação do *Consortium on Lithium Genetics* (ConLi^{+}Gen) pesquisadores tem dado preferência para o uso

de uma escala de avaliação retrospectiva desenvolvida por Martin Alda e colaboradores (Grof et al., 2002) a partir das observações clínicas de pacientes não submetidos a protocolos de tratamento que apresentavam remissão completa e sustentada da doença com lítio em monoterapia. A esse subgrupo de paciente passou-se a dar o nome de excelentes respondedores, representativos de um fenótipo provavelmente com componentes genéticos e herdabilidade próprios. Até o surgimento do ConLi^{+}Gen, os estudos independentes, na quase totalidade retrospectivos, utilizaram critérios próprios ou pouco específicos na determinação da qualidade de resposta ao tratamento com lítio.

A “escala de Alda”, como tem sido chamada a ‘‘*Retrospective Criteria of Long-Term Treatment Response in Research Subjects with Bipolar Disorder*’’ e em sua versão brasileira validada nomeada como “Critérios Retrospectivos de Resposta Terapêutica de Longo Prazo em Pacientes Com Transtorno Afetivo Bipolar” (Silva et al., 2016), apresenta dois grupos de critérios. O primeiro grupo se refere ao percentual de melhora na atividade da doença após uso de lítio (Critério A) e o segundo se refere a diferentes fatores relevantes que podem confundir a interpretação da melhora na atividade da doença (Critérios B1 a B5) (Anexo A).

O critério A tem um caráter mais subjetivo em que se considera a mudança no padrão de ciclagem durante o tratamento com lítio, sendo os valores maiores correspondentes à melhor resposta e os menores à pior resposta clínica. Assim sendo, uma pontuação de 10 deve ser dado na presença de resposta completa e de 0 no caso de piora ou ausência de melhora na frequência, duração e gravidade dos episódios. A pontuação intermediária aplica-se a uma resposta

muito boa (8 e 9), boa (6 e 7), moderada (4 e 5), leve (2 e 3) e mínima (1 e 2). O escore atribuível ao critério A varia, portanto, de 0 a 10.

O grupo B funciona como um fator de confiabilidade da observação clínica pois leva em consideração o número de episódios prévios à introdução da litioterapia (B1), a frequência de episódios previamente a litioterapia (B2), a duração do tratamento com lítio (B3), a aderência durante o período de estabilidade avaliada pelo resultado das litemias (B4) e a necessidade da associação de medicações adicionais durante o período de estabilidade (B5). Cada subcritério em B fornece uma pontuação entre 0, correspondendo a maior confiabilidade na determinação da resposta clínica, e 2, correspondendo a uma confiabilidade pobre para a resposta clínica obtida no critério A. O escore total da escala é obtido então subtraindo a soma dos critérios do grupo B do escore obtido no critério A [A-(B1+B2+B3+B4+B5) = total].

A aplicação da escala pode ser baseada em qualquer informação disponível, não necessariamente através de entrevistas diretas com os pacientes. Grof et al. (2002) utilizaram um ponto de corte igual ou maior que 7 para definir boa/excelente resposta. A concordância entre os aplicadores mostrou-se muito boa neste primeiro estudo (κ = 0,80). Tendo em vista o grande número de centros participantes do ConLi^{+}Gen a concordância e confiabilidade entre examinadores foi reavaliada mais recentemente (Manchia et al., 2013), o que permitiu estabelecer como melhor ponto de corte para uma definição de resposta dicotômica um escore total igual ou maior a 7 com κ = 0,66 (z = 112,18; 95%CI 0,38-0,86; p < 0,00001). Para definição de fenótipo contínuo de resposta o escore total apresentou uma correlação intraclasse de 0,74 (95%CI 0,59-0,89)

mas o escore do critério A apresentou uma correlação intraclasse de 0,66 (95%CI 0,49-0,85) e de 0,59 (95% CI 0,41-0,81) para o critério B. A concordância na pontuação do critério A apenas melhora com treinamento quando se considera como válidos os casos em que o escore total de B é menor ou iqual a 4; ou seja, a presença de muitos confundidores na determinação da resposta causa perda na confiabilidade da pontuação entre os examinadores. Ainda, a melhor confiabilidade para resposta parcial apresenta um escore total entre 3 e 6 e a não resposta é melhor definida para um escore total igual ou menor a 2.

Apesar da escala de Alda ser alternativa mais objetiva na mensuração de resposta em comparação a outros métodos de avaliação retrospectiva de resposta clínica, como afetivogramas, AMI (*Affective Morbidity Index*) e revisões de prontuário, é ainda necessário compensar as limitações na confiabilidade da escala de Alda, principalmente relacionadas aos critérios do grupo B. Uma pontuação alta nos critérios B não justifica clinicamente a caracterização de uma resposta inadequada, uma vez que eles quantificam confundidores e não ausência de resposta. Sendo assim, não parece ideal subtrair os critérios B do critério A. Exemplo frequente se relaciona à pobre aderência ao tratamento, que não necessariamente indica consequência de uma resposta inadequada, mas possível causa dessa resposta. Assim, poderia ser inserido um viés com tendência a resultados falso-negativos ao se utilizar o escore total.

De modo semelhante, uso prolongado de medicação adicional é bastante comum em nossa prática, especialmente em centros públicos de saúde mental. As dificuldades no controle adequado dos níveis séricos de lítio, a baixa frequência de consultas, a grande rotatividade dos médicos assistentes que desconhecem o histórico evolutivo dos pacientes, as questões

socioeducacionais que comprometem aderência e cuidados em doses ideais de lítio gerando maior risco de eventos adversos, a expectativa para a rápida estabilização do quadro associada à redução dos leitos disponíveis para momentos de crise, constituem fatores para manter associações desnecessárias e as vezes até mesmo prejudiciais para a estabilização do quadro. O manejo clínico deficitário em muitas situações é o responsável pela maior pontuação nos critérios B e na consequente classificação ruim de resposta. Corrigir essas deficiências psicométricas são necessárias para melhor classificação fenotípica do instrumento. Uma opção é usar os critérios B como fatores de exclusão, como o estabelecido em função da confiabilidade da pontuação para o critério A, ou transformá-lo matematicamente num fator de correção ponderado conforme a importância de cada subcritério para o indivíduo avaliado. Aspectos não contemplados no escore, como curso da doença, história familiar, idade de início, polaridade prevalente, tolerância a efeitos colaterais, comorbidades e uso de substâncias deveriam ser considerados como caraterísticas individuais que como já visto influenciam a resposta.

Teoricamente, o uso concomitante de estabilizadores de humor pressupõe a impossibilidade de pontuação, fato que não se estende aos antipsicóticos e antidepressivos. A combinação de anticonvulsivantes ao lítio é comum e clinicamente representaria uma resposta não excelente a monoterapia, mas no mínimo parcial. A exclusão destes casos não refletiria a realidade. Face

ao uso comum de associações medicamentosas, o uso de estabilizadores de humor foi considerado do mesmo modo que antipsicóticos e antidepressivos nesse estudo.

2.4 Mecanismos de ação do lítio relacionados a seu efeito terapêutico

A farmacocinética do lítio contrariamente à sua farmacodinâmica é bastante simples. Ele não se liga a proteínas plasmáticas nem sofre modificações dependentes de enzimas metabolizadoras. Sua absorção não sofre interferência da comida e o pico plasmático é atingido entre 1 e 3 horas para formulações comuns, enquanto para liberação controlada chega a ser de 4 a 12 horas. A quase totalidade, até 95%, é eliminada pela urina, o que depende da qualidade da filtração glomerular, e a sua meia-vida em indivíduos jovens é de 18 a 24hs. Essas variações na farmacocinética do lítio, em especial a posologia e a formulação adotada tendo em vista obtenção de maior aderência e menor efeito colateral tem repercussão na estabilidade dos níveis séricos cujas flutuações podem comprometer a eficácia terapêutica (Alda, 2006).

Pouco se conhece a respeito da farmacocinética de outros sais de lítio, além do carbonato correntemente usado e amplamente estudado. Orotato, cloreto, citrato, aspartato, salicilato e lactato de lítio são sais cuja segurança e eficácia não foram testados adequadamente (Smith et al., 2014). Dentre estes, o orotato de lítio é comercializado como suplemento em alguns países em doses baixas. Aparentemente algumas pessoas se beneficiam dessa formulação.

Lítio (Li^+), apesar de ser um metal alcalino com propriedades similares a magnésio, sódio e potássio, não apresenta um papel conspícuo na fisiologia celular como os demais. Aparentemente o transporte de vitamina B12 e B9 para o interior dos neurônios é dependente desse metal, mas não está claro se lítio atrapalha este mecanismo (Cervantes et al., 1999).

Indivíduos adultos não portadores de doenças neuropsiquiátricas e sem uso de reposição suplementar de lítio apresentam naturalmente concentrações muito pequenas desse metal, entre 15 a 20μEq/L (Kilts, 1998). Schrauzer (2002) apud Marshall (2015) estima que o requerimento mínimo diário de lítio seja de 1mg. Em regiões produtoras de lítio, como nos Andes, o consumo chega a ser de 30mg/dia. Como tratamento, propõe-se que seu nível sérico em fase de manutenção esteja entre 0,6 e 0,8mEq/L. O risco de recorrência em níveis abaixo de 0,4 é mais elevado, muito embora haja indivíduos que respondem em doses abaixo de 0,6. É reconhecido que níveis maiores, mais próximos a 1mEq/L favorecem o controle de mania. Edições recentes de alguns *guidelines* sugerem níveis entre entre 0,8 e 1mEq/L (CANMAT, 2018) e entre 0,6 e 1mEq/L (NICE, 2018).

2.4.1 Penetração em barreira hematoencefálica e membrana neuronal

Sua distribuição no tecido cerebral é normalmente heterogênea, com maiores níveis encontrados em córtex frontal seguido pelo núcleo caudado (Ramos et al., 2016). A concentração plasmática se relaciona proporcionalmente à concentração cerebral, sem contudo equalizar a distribuição, conforme

mostram estudos de espectroscopia de ^{7}Li por ressonância magnética (Lee et al., 2012). A razão entre lítio sérico e cerebral encontrada neste estudo foi de 0,39 ± 0,08 (r = 0,93) para a média da distribuição e de 0,92 ± 0,16 (r = 0,90) para o máximo local. Utilização de diferentes técnicas com menor ruído de sinal e maior resolução mostram resultados semelhantes em relação à distribuição heterogênea no tecido cerebral embora com diferentes áreas de maior concentração.

Essa desigualdade fica mais pronunciada quanto maior a concentração sérica, o que sugere uma preferência de absorção em regiões cerebrais com maior atividade enzimática associada ao efeito terapêutico. Os achados de Lee et al. (2012) revelam maiores concentrações cerebrais em rede límbica anterior, enquanto Smith et al. (2018) mostram significativa maior concentração em substância branca comparativamente à substância cinzenta, maior intensidade de sinal em tronco encefálico e corpo caloso posterior e menor intensidade em córtex orbitofrontal. Em camundongos jovens submetidos a suplementação com lítio por 4 semanas, a maior concentração foi observada em regiões neurogênicas, como giro denteado do hipocampo, zona subventricular e bulbo olfatório (Zanni et al., 2017), o que reforça a sua associação a mecanismos pró-proliferativos e anti-apoptóticos.

Nenhum mecanismo de transporte em membranas foi identificado como específico ao lítio. Em torno de 40% dos íons de lítio penetram nas células através do transportador de Na^{+}/Ca^{2+} e o restante através dos canais de sódio tanto voltagem-dependentes como dos canais de sódio epiteliais via

Competição iônica e através de canais de vazamento. Se concentram primariamente na membrana plasmática, seguido pela membrana microsomal e membrana nuclear. Dentre os metais alcalinos os íons de lítio têm a maior afinidade por membranas de fosfolipídios alterando sua fluidez e reorganizando a distribuição de receptores nos microdomínios lipídicos (Donati et al., 2015) o que promove modificações em sua funcionalidade.

No tecido cerebral, estima-se que a maior concentração de lítio se encontra no compartimento intracelular. Sendo um cátion é esperado que se ligue mais fortemente na face interna da membrana plasmática dado a sua maior concentração de fosfolípides aniônicos. Estudos de imagem em ratos mostram que mais de 50% da concentração cerebral total de lítio encontra-se no interior das células (Komoroski et al., 2013).

O efluxo de Li^+ ocorre através da bomba Na^+/H^+ por competição com H^+, dependente do gradiente de sódio. Nas membranas mitocondriais o transporte é mais significativo e ocorre através do trocador Na^+/Ca^{2+} em que o lítio ocupa o lugar de Ca^{2+}. Canais catiônicos sensíveis a ligantes pentaméricos, como receptores de acetilcolina, $GABA_A$, NMDA, 5HT3 e Glicina, também são permeáveis ao Li^+.

2.4.2 Ação em proteínas ligadas à membrana

A presença de íons de lítio desloca íons de magnésio (Mg^{2+}) ligados a sítios enzimáticos. O raio iônico de ambos é praticamente o mesmo (r = 0,60 Å

para Li^+ e r = 0,65 Å para Mg^{2+}), de modo que a presença de lítio em concentrações elevadas no tecido promove a substituição competitiva em enzimas moduladas por magnésio favorecendo o lítio para ligantes aniônicos ácidos fosfatados fracos, como fosfatos, pirofosfatos e ATP (Mota de Freitas et al., 2006). E esta competição pode responder em grande parte pelo mecanismo responsável pela eficácia da terapêutica com lítio. Nas concentrações séricas habituais lítio compete com magnésio inibindo IMPase (inositol monofosfato fosfatase), IPPase (inositol polifosfato fosfatase), subunidades αs e αi de proteínas G, o que promove redução dos níveis intracelulares de inositol e modulação dos níveis de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico). Já a concentração necessária para deslocar magnésio do resíduo 9-Ser na GSK3 (glicogênio sintase quinase 3) é maior (k_i = 2,0mM), demonstrando que a capacidade de competição ocorre em sítios de baixa afinidade ao Mg^{2+} (Mota de Freitas et al., 2006).

A atuação do lítio diretamente sobre os receptores de membrana foi alvo de muitos estudos moleculares iniciais, seguindo as hipóteses monoaminérgicas relacionadas aos transtornos de humor. A sugestão da ação direta do lítio sobre esses neurotransmissores e seus receptores se deveu a achados de variações nos níveis dessas substâncias no líquido cefalorraquidiano (LCR) com seu uso (EL-Mallakah, 1996). Resultados iniciais não se mostraram convincentes para justificar o efeito terapêutico do lítio sobre esses receptores.

2.4.3 Ação sobre a função sináptica

Em revisão clássica feita por Lenox e Hahn (2000) sobre a ação do lítio na modulação da transmissão sináptica, os autores levantam dados mostrando que o lítio aumenta o *turn-over* de dopamina em regiões específicas e reduz a sua produção, bem como diminui a super-sensibilidade dos receptores dopaminérgicos, que estaria associada à mania, e impede o efeito euforizante de anfetaminas. Estes efeitos, contudo, não ocorrem diretamente sobre os receptores D2 e D3, mas provavelmente via mecanismos pós-sinápticos. O efeito pré-sináptico sobre NA mostra-se bifásico, ou seja, inicialmente ocorre um aumento na síntese e com o uso crônico há o retorno aos níveis basais. De modo semelhante, ocorre primeiro um aumento nos níveis cerebrais de GABA e com o tempo sua normalização no patamar anterior. Entretanto, ocorre um aumento na expressão do receptor GABA subtipo B ($GABA_B$) no hipocampo com uso crônico de lítio, assim como ocorre com os anticonvulsivantes. Uma maior atividade do transportador de GABA (GAT1) é influenciada pela competição do Li^+ por um sítio de ligação de Na^+, o que é dependente da concentração de GABA (Zhou et al., 2006). De modo semelhante ocorre ativação de receptores inibitórios de glicina (Solntseva et al., 2016).

A transmissão serotoninérgica parecia até então ser a mais influenciada pela ação do lítio, ocorrendo aumento de proteínas relacionadas ao transporte de SER em regiões corticais, facilitação do *turn-over* de SER em córtex frontal e hipocampo, aumento da liberação de SER na fenda sináptica (Carli et al., 1997). A administração crônica de lítio inibe a resposta mediada por autorreceptores pré-sinápticos de SER do tipo 1A e 1B (5-HT1A e 5HT1B), responsáveis pela

liberação de SER, que é então controlada por inibição retrógrada (Haddjeri et al., 2000; Massot et al., 1999). Isto por sua vez causa, junto com o aumento do *turn-over* de SER, *down-regulation* desses receptores (Carli et al., 1997; Hotta et al., 1986).

Recentemente contudo observou-se a ocorrência de interação entre sítios de ligação de sódio no DAT e lítio como parte de um mecanismo de modulação alostérica da função do receptor, com repercussões sobre a regulação de sua permeabilidade (Borre et al., 2014). Considerando que DAT está estruturalmente relacionado a SERT e NET, todos pertencentes a família SLC6, esta interação pode ocorrer nos três principais transportadores de monoaminas. Assim, como visto para GAT1, alterações na permeabilidade e funcionamento de receptores de outros neurotransmissores modulados por sítios de acoplamento ao sódio ocorrem por competição com Li^+ (Tavoulari et al., 2016).

Lítio também aumenta a liberação de beta-endorfinas em hipotálamo, modulando a sensibilidade a dor em modelos animais (Weinsanto et al., 2018) embora o mecanismo bioquímico responsável por esse efeito, já observado em estudos prévios, não esteja esclarecido. Outros neuropeptídeos, como substância P, neuroquinina A e neuropeptídeo Y tem sua concentração aumentada em resposta ao uso de lítio, provavelmente por indução de transcrição gênica por mecanismos indiretos. Os neuropeptídios assumem um papel sistêmico, como galanina, vasopressina, leptina, ghrelina, fator de

liberação de corticotrofinas, hormônio liberador de hormônio de crescimento, todos com níveis modulados pela ação do lítio.

2.4.4 Ação sobre a neuroplasticidade

Como sugeria Jope (1999), a hipótese inicial previa que o lítio estabilizaria as flutuações dessa rede de neurotransmissão, corrigindo os processos regulatórios disfuncionais, tanto excitatórios quanto inibitórios, que serviriam como patofisiologia para o TB. Todavia, todas essas alterações observadas na atividade dos receptores monoaminérgicos são mais provavelmente determinadas indiretamente, pela ação nas cascatas de sinalização ativadas pelos neurotransmissores. E para que essa ação seja sustentada ao longo do tempo, modificações na estrutura sináptica devem ocorrer. Achados de imagem mostrando associação positiva entre menor volume de regiões associadas a regulação de humor, como córtex dorsolateral pré-frontal, córtex orbitofrontal e hipocampo, e curso pior da doença ou refratariedade ao tratamento revelaram a importância de mecanismos de controle da plasticidade e citoarquitetura neuronal na eficácia terapêutica dos estabilizadores de humor (Sanacora, 2008).

Dentro da perspectiva de modelação neuronal, o sistema glutamatérgico tem igual importância em relação aos demais. Os receptores NMDA são ativados pela ligação de glutamato e glicina e inibidos por magnésio. Ao competir com magnésio, Li^+ agudamente estimula o receptor, mas com o tempo isso se estabiliza devido ao mecanismo de *down-regulation* induzido, com aumentada

recaptura de glutamato, o que estabiliza a neurotransmissão glutamatérgica. Desde modo atuaria no controle da excitação maníaca. Paralelamente, lítio inibe influxo de cálcio em receptores NMDA, o que interfere nos mecanismos de neuroproteção, favorecendo-a. Contrariamente à ação direta do lítio nestes receptores, a ação facilitadora da neurotransmissão em receptores 5HT1A inativa receptores NMDA, enquanto a redução na atividade dos receptores D1 aumenta a atividade dos receptores NMDA. Todo esse mecanismo de regulação é modulado por lítio, antipsicóticos e antidepressivos.

A regulação da neuroplasticidade depende de mecanismos associados às vias intracelulares de tradução de sinais regulada pela atividade destes receptores de membrana. Da ativação ou inibição destas vias dependem as modificações estruturais que garantiriam a adequada resposta às drogas em longo prazo. E em virtude do acoplamento de grande parte dos receptores sinápticos de monoaminas a proteínas G, toda a rede intracelular associada à sua atividade está sujeita à interferência dos psicotrópicos.

2.4.5 Ação na regulação do ciclo do inositol

Inositol é substrato essencial para síntese de fosfatidilinositois e pirofosfatos derivados, que além de servirem como estoque de fostato, atuam como sinalizadores na mediação do crescimento e proliferação celular, apoptose, ação hormonal, regulação de processos intra e extracelulares. O suprimento externo de mio-inositol entra na célula através do transportador de sódio e mio-inositol (SMIT). A presença de um mecanismo celular relativamente

amplo, com diferentes passos enzimáticos e isômeros, parece ser evolutivamente importante para manutenção e dinâmica das membranas de fosfolípides, especificação de diferentes tipos de sinalização e controle da disponibilidade de fostato, uma vez que é necessário para viabilidade de processos químicos dependentes de ATP e para a estrutura do DNA.

Depleção de inositol ocorre na presença de lítio. Com a ativação da fosfolipase C (PLC) mediada pela atividade de receptores de membrana, como os noradrenérgicos α_1, receptores colinérgicos do tipo M1, receptores serotonérgicos tipo 5HT1C e 5HT2, receptores histaminérgicos tipo H1, e receptores glutamatérgicos (Nahorsk, 1988), a fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) é clivada em inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG). A IP3 é reciclada através de seguidas defosforilações catalisadas por IPPases e IMPase. Inositol e inositolfosfatos podem ser fosforilados, alternativamente, por inositol-fosfato-quinases (PIK).

Os estoques celulares de cálcio mitocondriais e em retículo endoplasmático (ER) são controlados por IP3 que promove a sua liberação no citoplasma. IP3 também ativa proteína quinase B (PKB/AKT) que controla vias celulares metabólicas e ciclo celular. DAG por sua vez ativa proteína quinase C (PKC) que também sofre ativação pelo cálcio e tem como um de seus substratos a proteína *myristoylated alanine-rich c kinase substrate* (MARCKS) que regula a liberação de neurotransmissores.

De outro modo, os receptores dopaminérgicos D1 e noradrenérgicos β, estimulam a atividade da adenilil ciclase (AC) enquanto os receptores dopaminérgicos D2 e colinérgicos do tipo M2 a inibem (Yu; Greenberg, 2016). A

ativação é mediada pela subunidade α da proteína G_s e resulta na formação de monofasto cíclico de adenosina (cAMP) que se liga às proteínas quinase A (PKA), cuja ativação fosforila canais iônicos voltagem-dependentes, IP3, fatores de transcrição, estruturas do citoesqueleto, tirosina hidroxilase, receptores nicotínicos e receptores noradrenérgicos β. G_i pode impedir a ativação da proteína G_s, evitando assim a estimulação da AC. A formação de cAMP através da ativação de PKA regula formação de *cAMP response element binding transcription fator* (CREB) que promove transcrição de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2).

Postula-se que lítio diretamente iniba a atividade da IMPase e de uma IPPase (INPP1) quando em altas concentrações impedindo a reciclagem de IP3 e assim depletando inositol (Yu; Greenberg, 2016). Também há evidências de que promova a modulação da atividade de AC reduzindo as flutuações de cAMP intracelular, que iniba PKC reduzindo concentração intracelular de cálcio, que iniba MARCKS reduzindo liberação de neurotransmissores e que iniba a expressão e a atividade de SMIT limitando o aporte de mio-inositol. Lítio parece atuar de modo sinérgico a CREB em alguns sítios promotores de transcrição no DNA, como em promotores I e IV de BDNF e em região promotora P1 de Bcl-2.

A proteína receptora de IP3 (IP3R) interage com a proteína neuronal sensora de cálcio tipo 1 (NCS-1) de modo a aumentar a atividade do receptor de IP3 amplificando a sinalização dependente de cálcio (Kasri et al., 2004). Alguns estudos mostraram associação entre maior expressão tecidual dessa proteína em cérebros de portadores de TB (Garcia-Rill et al., 2019). Lítio inibe a interação entre NCS-1 e IP3R em neurônios do núcleo pedunculopontino, que participa do

sistema ativador reticular regulando oscilações corticais de alta frequência tipo gama (D´Onofrio et al., 2017). A presença de lítio reduz a ativação resultante dessa interação molecular de modo a conter o estado de hiperexcitação cortical. Embora uma ação direta sobre moléculas envolvidas nestes mecanismos ainda não esteja definida, há uma significativa possibilidade de que o lítio iniba IP3R.

2.4.6 Ação sobre proteínas quinases em vias de sinalização intracelular

Um dos principais sítios de ação do lítio é a enzima serina/treonina proteína quinase glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). Sua atividade regula diversas vias associadas à manutenção celular e metabolismo energético, resposta a estímulos estressores desencadeados por reações imunológicas e inflamatórias, neurodesenvolvimento e arquitetura neuronal, senescência e modulação da neurotransmissão. Esta quinase tem portanto uma posição central na rede de integração de sinais intracelular. A sua isoforma beta (GSK3B) é ubíqua no citoplasma e parece estar mais associada à regulação de comportamentos associados ao humor e cognição, embora a isoforma alfa (GSK3A) também seja alvo da ação do lítio e compartilhe muitas ações de GSK3B (Pardo et al., 2016).

A atividade de GSK3B é controlada por fosforilação em resíduos específicos de tirosina, que determina ativação enzimática, e serina, cuja fosforilação determina inibição enzimática e é a maneira principal de regulação de sua atividade em neurônios. Várias proteínas quinases regulam sua fosforilação, como por exemplo AKT, PKC, PKA e proteína quinase dependente

de cálcio/calmodulina II (CaMK II), sendo a primeira, em sua isoforma AKT1, responsável pela maior atividade inibitória.

Lítio desloca magnésio de seus sítios na GSK3B e assim inibiria sua capacidade catalítica ao mesmo tempo em que indiretamente promove a fosforilação dos resíduos de serina através da inibição de proteínas fosfatases ou através do aumento da atividade de PKC e AKT1 (Pasquali et al, 2010). O efeito indireto parece ser o mais provável uma vez que a constante de ligação ao sítio ligado ao resíduo 9 de serina na presença de magnésio *in vitro* ultrapassa o limiar potencialmente tóxico (Matos et al., 2016).

Há uma interdependência entre diferentes vias de sinalização na modulação de efeitos decorrentes da estimulação de receptores de membrana (Yu; Greenberg, 2016). PKA fosforila GSK3 na presença de altos níveis de cAMP decorrente da estimulação por adrenalina e glucagon (Beurel et al., 2015). Fatores de crescimento inibem GSK3 via ativação de PI3K/AKT (Matsuda et al., 2019), o que ocorre também com insulina, bem como através da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Beurel et al., 2015).

A fosforilação de outros sítios com repercussão sobre a atividade enzimática pode ocorrer como no caso da inibição via ação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK) (Beurel et al., 2015), que causa acumulação nuclear de β-catenina em neurônios. β-catenina é importante sinalizador de transcrição gênica ao se associar com fatores da família TCF/Lef ligando-se a sítios promotores. Sua degradação é feita por um complexo enzimático do qual GSK3 participa (Valenta et al., 2012). Apenas uma via de estimulação de GSK3 é conhecida e envolve a defosforilação do resíduo 9 de

serina pela proteína fosfatase 1 (IPP1), cuja ativação está associada ao influxo de cálcio via receptores NMDA.

Internalização de receptores AMPA desencadeia apoptose e se associa ao mecanismo de depressão de longa duração (LTD), favorecida pela ativação de GSK3B; enquanto a sustentação do mecanismo de potenciação de longa duração (LTP) é proporcionada através da inibição de GSK3B via PI3K/AKT (Bradley et al., 2012). GSK3B promove endocitose de receptores AMPA provavelmente mediada por fosforilação da subunidade GluA2 e como resposta regulatória dos mecanismos de LTP e LTD. A presença de lítio é capaz de bloquear a LTD e promover LTP (Voytovych et al., 2012).

AKT e GSK3 apresentam uma dinâmica de regulação mútua a qual representa mais um ponto de convergência na ação de antipsicóticos, estabilizadores de humor (lítio e valproato) e antidepressivos. O bloqueio de receptores D2 pelos antipsicóticos permite a ativação de AKT que por sua vez inibe GSK3B. A estimulação dos 5HT2A também reduz a fosforilação de GSK3B enquanto a estimulação de receptores 5HT1A, 5HTIB e muscarínicos fosforilam GSK3B inibindo-a.

Os receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2), receptores de estrogênio (ERα e ERβ) e receptores de glicocorticóides (GluR) são substratos de GSK3B. Estimulação de IRS inibe GSK3B via PI3K/AKT enquanto a estimulação de GluR ativa GSK3B (Patel; Woodgett, 2017)

2.4.7 Ação sobre vias de sinalização imunoinflamatórias

Outros substratos fosforilados pela ação de GSK3B envolvem as vias de modulação da resposta imunológica e inflamatória e vias associadas a organização de ciclo circadiano. GSK3 promove a fosforilação de NF-kB e STAT3, reguladores importantes da produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto inibe CREB e AP-1, responsáveis pelo aumento na expressão de IL-10. A inibição da atividade de GSK3B portanto reduz a resposta inflamatória inata. A resposta imune adaptada mediada por células $CD4^+$ T necessita de regulação pela GSK3, que sob indução de IL-6 promove a diferenciação de determinado subtipo celular (Beurel, 2014). Neste caso, GSK3A atua diferentemente ao suprimir essa diferenciação via inibição pela AKT1 e proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), ambas atuando sob indução de IL-1. Há uma pletora de estudos relacionando os quadros psiquiátricos e alterações na produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais têm sido propostas como potenciais biomarcadores de doença e resposta a tratamento.

Elevação da concentração de marcadores inflamatórios tem sido constantemente encontrada em LCR e sangue de vítimas de tentativa de suicídio, bem como em cérebros de vítimas de suicídio (Brundin et al., 2017). O estresse ambiental, seja químico ou físico ou psicológico e a consequente ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal promove a ativação de GSK3 no cérebro via estimulação de *Toll-like receptor 4* (TLR4), glicoproteína de membrana e GluR, o que desencadeia a produção de neuroinflamação. As citocinas também ativam as vias catabólicas de triptofano, em especial a via de quinurenina, cujos produtos são agonistas de receptores NMDA em células

microgliais, inibem a captação de glutamato por astrócitos, bloqueiam receptores colinérgicos, competem com glicina na ligação de receptores NMDA e antagonizam receptores AMPA (Lovelace et al., 2017). Sugere-se em virtude desses mecanismos que a desregulação das vias inflamatórias poderia se associar à presença de ideação e tentativas de suicídio em subgrupo de portadores de quadros afetivos. Reforçam essa ligação achados de ideação suicida significativamente associada à maior concentração de marcadores inflamatórios em não portadores de transtorno de humor (Bergmans et al.; 2019).

Lítio reduz a produção de prostaglandinas possivelmente via ação inibitória sobre a liberação de ácido araquidônico a partir da membrana fosfolipídica mediada por fosfolipase A2 (PLA2) além de inibir a expressão gênica de COX-2 (Rao et al., 2008). Lítio também ocasiona aumento na secreção, e talvez produção, de TNF-α de modo dose-dependente, mecanismo possivelmente relacionado com granulocitose observada em alguns pacientes. Outras citocinas pró-inflamatórias tem sua produção aumentada por lítio, como IL-1β e INF-γ, enquanto outras tem sua produção atenuada, como IL-6; bem como ocorre aumento de produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-2 e IL-10 (Nassar; Azab, 2014). Dada a relação de GSK3 com a regulação da resposta inflamatória, sua inibição pelo lítio deve ser a responsável pela maior parte da sua ação anti-inflamatória.

2.4.8 Ação sobre a dinâmica mitocondrial

A dinâmica mitocondrial é fundamental para a preservação das funções

associadas a neuroplasticidade. A sua mobilização e localização nos neurônios é influenciada pela concentração de Ca^{2+} e ATP e depende da integridade da proteína *disrupted in schizophrenia 1* (DISC-1). A função sináptica e a neurotransmissão são influenciadas pela disponibilidade da produção energética e concentração de Ca^{2+}. A homeostase de cálcio é dependente de vários mecanismos envolvendo IP3R, cuja ativação faz aumentar o influxo de cálcio no citoplasma. Por outro lado, a proteína anti-apoptótica Bcl-2 inibe a liberação de cálcio mediada por IP3R e modula os canais de cálcio de membranas celulares.

A produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) derivadas da produção de ATP necessita ser neutralizada para evitar efeitos deletérios sobre DNA, lípides e proteínas da própria organela. Altas concentrações de cálcio e ROS resultam na ativação de cascatas de enzimas cisteína-protease (CASPASE), quinases c-Jun NH2terminal (JNK), p38 MAPK e receptores de TNF-α. Paralelamente, a exposição a ROS leva à disfunção mitocondrial e consequente ativação de GSK3 (Luca, Calandra, Luca, 2016). Isto promove maior permeabilidade de membrana mitocondrial liberando ROS e enzimas pró-apoptóticas que desencadeiam autofagia e/ou morte celular. Esse mecanismo é essencial na neuroplasticidade, pois promove a eliminação de agregados moleculares, organelas ou sinapses irremediavelmente disfuncionais, desnecessárias ou associadas a processo patológico.

Lítio age inibindo fosforilação e ativação de p38 e JNK e atenua a ativação de Caspase-3 em células sob estresse metabólico, o qual aumenta a geração de ROS (Aminzadeh et al., 2014). Quando disfuncional, esse mecanismo pode desencadear processos deletérios que comprometem temporária ou progressivamente a homeostasia neuronal. O estresse oxidativo parece ser o

principal processo na neurodegeneração e na disfunção sináptica. A manutenção do equilíbrio oxidativo está interligada a vias associadas a resposta imune e inflamatória e a vias metabólicas, que regulam conjuntamente a viabilidade e funcionalidade celular. Na confluência dessas vias moleculares está a GSK3. AKT é ativada por estresse oxidativo em neurônios desencadeando inibição de fatores de transcrição associados a apoptose (FOXO). A ativação sustentada de AKT porém pode determinar maior susceptibilidade a eventos oxidativos, pois a inibição de FOXO3a deixa de induzir a expressão de superóxido dismutase 2 (SOD2), importante enzima com ação antioxidante.

Lítio também aumenta a expressão de BCL-2 e ativa a PI3K promovendo a translocação de GSK3 para o interior da mitocôndria bem como sua maior inibição por AKT1 e assim bloqueia o processo de apoptose.

2.4.9 Ação sobre mecanismos de autofagia

AKT, uma vez ativada via PI3K e seu produto PIP3, move-se para o citoplasma e núcleo onde promove a ativação do complexo mTOR, que está associada ao metabolismo de glicose e produção energética, função mitocondrial, crescimento celular e autofagia. Sua atividade é modulada por aminoácidos, níveis de ATP, hormônios e fatores de crescimento (Saxton; Sabatini, 2017).

Essa proteína se agrega a outras proteínas formando dois complexos diferentes com acões específicas. O complexo mTORC1 regula a ativação de fatores de transcrição associados a homeostase metabólica e energética,

promove a síntese protéica, lipídica e nucleotídica e regula os mecanismos de autofagia. O complexo mTORC2 regula proliferação e sobrevivência celular primariamente por fosforilação de membros da família PKC e por fosforilação e ativação de AKT.

Os processos de controle de envelhecimento celular incluem autofagia, perda telomérica, mutação somática e disfunção mitocondrial comprometendo a produção de ATP. A modulação desses processos envolve em grande parte a sinalização mediada por PI3K/AKT/mTOR/GSK3 (Mancinelli et al, 2017), cuja disfunção também se associa ao surgimento de diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neuropsiquiátricas e câncer. No estado de equilíbrio funcional, a atividade integrada dessas enzimas assegura neuroproteção através do controle dos processos envolvidos na neuroplasticidade.

A autofagia é regulada também através da fosforilação de proteínas cerebrais associadas a microtúbulos, responsáveis pela manutenção da estrutura axonal e dendrítica, sendo tau a principal delas. A acumulação de formas patológicas de tau hiperfosforilada causa prejuízo no transporte axonal levando à disfunção neuronal e perda de sinapses, o que deixa os neurônios mais vulneráveis a insultos por estresse oxidativo, por desregulação de cálcio, inflamação e disfunção mitocondrial conduzindo à morte celular (Pérez et al., 2018). Isoformas e variantes polimórficas da tau conferem diferente susceptibilidade a neurodegeneração. Sua fosforilação é induzida no tecido cerebral por GSK3B como resposta à disfunção na sinalização de insulina, na privação de glicose, por ação de glucocorticóides, opiácios e etanol. Está ainda associada a processo de senescência normal e regulação da plasticidade sináptica. Sua defosforilação é controlada por diversas fostatases, sendo a PP2A

a principal. A ruptura do equilíbrio dinâmico em favor da fosforilação determina o início de processos patológicos encontrados em diferentes doenças degenerativas do SNC, notadamente na Doença de Alzheimer (Castellani; Perry, 2019).

Outro aspecto se apresenta na regulação da autofagia, pois o lítio a regulada de maneira dose-dependente (Sarkar et al., 2005). A inibição de GSK3B por maiores concentrações de lítio (em torno de 2mM) reduz autofagia através da ativação da ação inibitória de mTOR. Alternativamente, a autofagia é induzida por lítio em menores concentrações (em torno de 0,8mM) via inibição de IMPase o que causa depleção de inositol e diminuição dos níveis de IP3. Ao inibir a atividade de GSK3B lítio reduz fosforilação da tau, o que promove sua ligação aos microtúbulos.

Importante integração entre GSK3B e mTOR ocorre no controle do processo autofágico. O complexo mTORC1 exerce atividade inibidora sobre GSK3 o que reduz a expressão de citocinas inflamatórias e interrompe processo de autofagia. Alternativamente, a hiperatividade de GSK3 inibe autofagia através da dissociação de mTORC1.A consequente redução da sinalização por mTOR aumenta o processo autofágico com eliminação da tau fosforilada solúvel (Motoi et al., 2014). O aumento de consumo energético e a privação de glicose leva ao aumento da razão ADP/ATP o que ativa AMPK como sinalização de estresse celular. Isto por sua vez bloqueia a atividade do complexo mTORC1 e assim ativa mecanismos autofágicos. AMPK ativa diretamente a cascata de autofagia independente de mTORC1.

2.4.10 Ação sobre controle de apoptose

O tratamento crônico com lítio reduz a produção de peptídios amilóide beta (Aβ) modulando diretamente a clivagem da proteína precursora de beta-amilóide (APP). Esses peptídeos parecem responder pela ativação de enzimas quinases, modular estresse oxidativo, regular transporte de colesterol e agir como fatores de transcrição. Indiretamente, lítio exerce uma proteção contra os efeitos de Aβ ao promover aumento da expressão de Bcl-2, importante fator anti-apoptótico, e reduzir expressão de fatores pró-apoptóticos, como p53. Aumento da síntese de outros fatores neurotróficos está associada ao efeito do uso crônico do lítio, como BDNF, fator neurotrófico derivados das células da glia (GNDF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Aumento de VEGF resulta em ativação da via PI3K levando a ativação de AKT e da via de PLC- γ /PKC levando a ativação de ERK/MAPK.

A presença de agregados de Aβ facilita a hiperfosforilação da proteína tau, desequilibra a homeostase de cálcio e causa disfunção e perda neuronal. Essas alterações são mediadas por ação sobre receptores de glutamato mGluR5 e ativação sequencial de receptores NMDA. Sua formação também causa alterações na sinalização de insulina, na atividade de AKT e de transportadores de glutamato em astrócitos, como SLC1A3 e SLC1A2 (Huang et al., 2018). Os aglomerados de Aβ bloqueiam a ativação dos receptores de insulina (IR) e promovem redução na fosforilação de AKT e mTOR em astrócitos, o que inibe a síntese protéica de SLC1A (Han et al., 2016).

A via de sinalização Wnt/β-catenina canônica está envolvida no

desenvolvimento e manutenção do SNC regulando sinaptogênese e neurogênese em hipocampo. Fibrilas e oligômeros de Aβ induzem a desestabilização dos níveis de β-catenina, o que é revertido pelo lítio provavelmente via ação inibitória sobre GSK3B. A via não canônica de Wnt regula o ambiente pós-sináptico, controlando o tráfego, localização e retenção de receptores. Isto ocorre mediado por mecanismos dependentes de cálcio envolvendo IP3R, RE e mitocôndrias. Na presença de Aβ essa via regula a incorporação de cálcio pelas mitocôndrias preservando a função neuronal do aumento celular de Ca^{2+} relacionado à atividade sináptica. Bcl-2 sofre modulação em sua expressão pela atividade da via Wnt e exerce um papel protetor aos efeitos de Aβ sobre a membrana mitocondrial (Arrázola et al., 2015).

Assim como os ROS/NOS e as citocinas pró-inflamatórias, os oligômeros de Aβ comprometem a integridade da barreira hematoencefálica, aumentando a exposição do tecido a elementos neurotóxicos sistêmicos.

A produção de Aβ segue um ritmo circadiano, aumentando na vigília. Orexina, neuroproteína que promove vigília é necessária para produção de Aβ. O aumento na produção de Aβ leva à formação de placas que são neurotóxicas e respondem em parte pela neurodegeneração observada em Doença de Alzheimer e outras demências. Melatonina tem ação anti-agregatória de Aβ. Estatinas, alguns endocanabinóides e liraglutida promovem a redução de Aβ. Aβ modula os receptores TLR-4 na ativação de astrócitos e micróglia induzindo a produção de citocinas inflamatórias, especialmente NF-kB (Aghamandi et al.; 2017). A estreita relação entre estresse, disfunção de ritmo circadiano e prejuízos de cognição pode ser compreendida pela modulação da ação de melatonina através da regulação de Aβ.

Importante ativador da produção de Aβ é estresse. A produção de fator de liberação de corticotrofinas aumenta a atividade de clivagem de APP (Alghamandi, 2018). Aumento resultante de Aβ sustenta a ativação do eixo hipotálamo-hipofisário.

Em células da glândula pineal a ativação dessa via por Aβ desorganiza a produção de melatonina. Aβ também modula diretamente os receptores melatoninérgicos (MT1 e MT2), provavelmente por bloqueio de seus sítios ligantes ou por dissociação de proteínas do complexo G (Cecon et al., 2015). As ações decorrentes da estimulação desses receptores são mediadas pela via cAMP/PKA/ERK/CREB. Por sua vez, melatonina inibe a formação de Aβ e sua agregação, além de atenuar a fosforilação da tau.

As proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), também chamadas de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), são ativadas pela sinalização via proteínas G e/ou pela sinalização via β-arrestina. Sua localização citoplasmática, onde forma um complexo com proteína quinase ativada por mitógeno (MEK/ERK) ou nuclear, determina sua função. A via MEK/ERK está ligada à neurotoxicidade envolvendo receptores NMDA e sua ativação na presença de lítio favorece a neuroproteção independente da ativação de PI3K/AKT (Xia et al., 2008). O aumento da fosforilação de ERK pelo lítio leva ao aumento de níveis de p53 de modo a estimular apoptose. Mecanismo independente ocorre intermediado por estabilização de β-catenina. Inversamente, os níveis de p53 são reduzidos pela fosforilação de p38 MAPK induzida por lítio, o que se mostra contrário ao papel esperado pela ativação de p38 MAPK que seria regular negativamente o crescimento celular (Tsui et al., 2012). A dinâmica complexa da via ERK/MAPK reflete a intrincada relação de

equilíbrio dos efeitos pró e anti-apóticos desempenhados pelo lítio.

A atividade de ERK, por sua vez, pode ser regulada via cAMP/PKA, bem como ser estimulada ou inibida na presença de lítio dependendo do tipo de célula (Pardo et al., 2003). Importante ressaltar que o lítio age diferentemente conforme o processo patológico subjacente à dinâmica neuronal e vias de sinalização atuantes.

2.4.10 Ação sobre ciclos biológicos e ritmos circadianos

Lítio induz a produção de TNFa via ERK através de provável ação sobre a fosforilação de MEK e de modo independente de GSK3B e, na presença de ligantes de TRL, via NF-kB, exercendo seu efeito inflamatório.

A expressão e atividade enzimática de GSK3B ocorre de modo cíclico e circadiano. Alguns de seus substratos compõem a via de controle do ritmo circadiano, em especial PER2, CRY2, REV-ERB*α* e ROR*α*. O ritmo das oscilações apresentadas pelo núcleo supraquiasmático é dependente do controle da atividade dessas proteínas, idealmente promovendo maior frequência durante o dia e menor frequência durante a noite. Embora todas as células expressem genes circadianos, apenas o núcleo supraquiasmático é capaz de determinar e sincronizar ritmos, funcionando como um marcapasso para as demais regiões cerebrais (Vadnie; McClung, 2017). A maior parte de seus neurônios são gabaérgicos. Além das projeções neuronais para diferentes áreas cerebrais relacionadas a vigília, esses neurônios controlam a secreção de melatonina pela glândula pineal.

De modo inverso, melatonina age sobre esses sistemas suprimindo sua atividade e aumentando a amplitude dos ritmos fisiológicos. Lítio em doses terapêuticas se associa ao alongamento do período de atividade do núcleo supraquiasmático, bem como aumenta a amplitude de ritmos fisiológicos e comportamentais em modelos animais (Yokoshima; Honma, 2016). Sua ação corrigiria o avanço de fase e ritmos dessincronizados. O mecanismo de ação envolvido nesta modulação mais provavelmente está relacionado à inibição de GSK3B. Inversamente, alguns inibidores de GSK3B encurtam o período de atividade do núcleo supraquiasmático, como o valproato. Tendo em vista sua ação inibitória sobre as histonas deacetilases (HDACs), as qual modulam a atividade de fatores de transcrição ligados a cronobiologia, como CLOCK e BMAL1, que estão associados aos genes de controle circadiano, um mecanismo paralelo de ação pode estar envolvido, inclusive pela possível facilitação da expressão de alguns genes pela ação local do lítio diretamente nos seus promotores.

2.4.12 Ação sobre a plasticidade sináptica

O papel das neurotrofinas na função sináptica ficou evidente desde os estudos iniciais. BDNF está envolvido em ampla cadeia de processos neurofisiológicos, possui várias isoformas ativas e se integra com diferentes receptores controlando diversas vias de sinalização Sua função se diferencia conforme o estágio de desenvolvimento cerebral e inclui regulação da gênese e função das sinapses, especialmente no controle de mecanismos ligados a LTP e

LTD. A secreção de sua forma precursora (pro-BDNF) ou madura (BDNF) no espaço extracelular possibilita sua atividade sobre receptores de sortilina (SORT) no primeiro caso e sobre receptores de neurotrofinas e de tirosina quinase B (TrkB) no segundo. Esses receptores são translocados para membrana na presença de Ca^{2+}, cAMP ou impulsos elétricos (Kowianski et al., 2018). A ação de pro-BDNF sobre seus receptores ativa cascatas de sinalização mediadas por NF-kB, JNK e RhoA, desencadeando processos de manutenção celular, apoptose e crescimento e motilidade neuronal respectivamente. A ligação da isoforma madura a TrkB promove sua fosforilação, o que ativa diversas enzimas como PI3K, MAPK, PLC- ɣ, GTPases (Leal et al., 2014).

A razão entre a concentração de pro-BDNF e BDNF determina as vias a serem ativadas. Pro-BDNF atua negativamente na remodelação neuronal deteriorando a função sináptica, contribuindo para o mecanismo de LTD. Ao contrário, BDNF é capaz de manter as sinapses e reduzir a excitabilidade de interneurônios gabaérgicos hipocampais e assim ativar LTP (Kowianski et al., 2018). Seu efeito pré-sináptico não estimula liberação de glutamato e GABA enquanto sua ação pós-sináptica aumenta a concentração de receptores de AMPA resultando em LTP (Guo et al., 2018).

Ambos os mecanismos em equilíbrio promovem a neuroplasticidade com otimização das funções sinápticas. Variantes estruturais do pro-domínio determina diferenças na sua interação com os receptores SORT e consequente diferença na sua funcionalidade, condição que pode representar a base para a neurodegeneração observada em algumas doenças (Kowianski et al., 2018).

BDNF também inibe influxo de cálcio mediado por receptores NMDA reduzindo a excitotoxicidade glutamatérgica e prevenindo a disfunção

mitocondrial e morte celular (Fletcher et al., 2018). A estimulação de receptores NMDA e aumento de influxo de cálcio também pode ocorrer e isto resulta na ativação de CREB. Este fator induz expressão de genes envolvidos nos mecanismos de proteção celular, inclusive do próprio BDNF, além de Bcl-2. Essas vias regulatórias integradas responderiam pelo seu efeito neuroprotetor (De Vincenti et al., 2019).

Durante a neurogênese, BDNF influencia a diferenciação neuronal associando-se a receptores serotonérgicos de modo sinérgico. Além de indução de desenvolvimento neuronal, sua ação promove a proliferação de células gliais durante processos patológicos, causando inibição reativa da neurogênese.

Há uma operação importante entre BDNF e diversos neurotransmissores, especialmente óxido nítrico (NO). O aumento de NO induzido pela ação de BDNF promove expressão de genes dependentes de CREB melhorando efeitos sobre a potenciação das sinapses. Há uma autoregulação nesse processo, uma vez que NO exerce modificações pós-tradução em BDNF reduzindo sua afinidade pelos receptores TrkB e comprometendo sua ação neurotrófica (De Vincenti et al., 2019).

2.4.13 Ação sobre o comprimento de telômeros

Telômeros são regiões de repetições de sequência de nucleotídeos (5´-TTAGGG-3´) localizadas no final dos cromossomos de células eucarióticas. Tem como função a prevenção de replicação de células genomicamente instáveis

além de regular funções celulares específicas. Seu tamanho se reduz a cada divisão celular e essa redução é acelerada por exposição a estresse continuado (oxidativo, inflamatório, químico, hormonal) como observado em doenças crônicas e associadas ao envelhecimento (Squassina et al., 2018). Atividade da enzima telomerase se dá através da ação da subunidade catalítica *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT), que juntamente com disponibilidade de proteínas envolvidas na dinâmica do telômero, regula o seu tamanho.

Encurtamento do telômero tem sido correlacionado com TB (Huang et al., 2018) bem como com surgimento de doenças associadas ao envelhecimento. Há evidências de que parentes de primeiro grau não afetados de indivíduos com TB tem telômeros mais curtos em relação aos controles implicando maior risco familial à doença (Powell et al., 2018). Em virtude de associação de TB com doenças metabólicas, cardiovasculares, câncer e demência (Forty et al., 2014) juntamente com estilos de vida menos saudáveis e grande estresse psicológico (Aldinger; Schulze, 2017) os telômeros podem ser importantes mediadores dessa conexão (Squassina et al., 2018). Além disso, a proposição de estadiamento e neuroprogressão do TB pode depender da perda de fatores de proteção celular, como as consequentes do encurtamento telomérico, ou promover em conjunto a perda esse encurtamento.

Estudos de mensuração de comprimento de telômero (TL) ao longo do tempo em TB dão suporte a essa conexão (Huang et al., 2018). Em virtude das vias moleculares envolvidas nesse processo e sua interface com os mecanismos de ação de lítio, crescente interesse tem se voltado para estudo dessa estrutura nas alterações de humor e sua relação com o tratamento.

A atividade da telomerase regula a transcrição de fatores de crescimento,

além de preservar o tamanho dos telômeros. Há evidências de que module comportamentos depressivos em virtude de sua ação em hipocampo, com relatos de aumento de sua atividade associada à gravidade da depressão, como tentativa de compensação do efeito estressor da doença, e como resposta ao uso de antidepressivos. Estudo mensurando atividade de telomerase em episódio depressivo em portadores de TB usando lítio como monoterapia por 6 semanas encontrou associação negativa entre efeito antidepressivo e atividade da telomerase sérica ($r = -0,56$; $p = 0,007$), sugerindo uma compensação pelo efeito terapêutico ao longo do tempo (Soeiro-de-Souza et al., 2014).

Diversos achados apontam para uma redução significativa no TL em leucócitos (LTL) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) conforme o número de episódios depressivos aumenta (Rizzo et al., 2013; Martinsson et al., 2013; Elvsashagen et al., 2011); mas não se encontrou associação com subtipo de doença, ciclagem rápida, tentativa de suicídio ou tempo de duração da doença. Meta-análise recente entretanto mostrou que bipolares e controles não diferem no comprimento do telômero em sangue periférico (Colpo et al., 2015). A correlação entre os achados em sangue periférico e TL em cérebro ainda não está estabelecida embora se saiba que a telomerase seja abundante em tecido cerebral.

LTL se associa positivamente à duração do uso de lítio em pacientes com TB, sendo 10% maior em respondedores, após ajuste para idade, número de episódios depressivos e tempo de uso, conforme escala de avaliação retrospectiva (Escala de Alda) em estudo de Martinsson et al. (2013). Squassina et al. (2016) encontraram correlação entre o tempo de uso de lítio em pacientes tratados por mais de 2 anos independentemente da idade, da resposta

terapêutica (conforme escala de Alda) e do método utilizado para determinação do TL. Considerando uso de ácido valpróico e/ou lítio, Lima et al. (2014) não encontraram diferenças entre LTL para o tipo de droga utilizada. Recentemente, outro grupo demonstrou aumento de LTL em pacientes tratados com lítio por longo tempo em comparação com não usuários de lítio e em comparação a seus familiares não bipolares (Powell et al., 2018). Aumento significativo de TL também foi observado com o tratamento de episódios de mania com uso de lítio associado a antipsicótico (Çinar, 2018). O TL mostrou-se significativamente menor nos pacientes em relação aos controles e a expressão de hTERT significativamente maior em relação aos controles e na comparação entre a medida basal e a medida em remissão.

O maior estudo de GWAS de TL revelou um componente poligênico significativo, com uma herdabilidade de SNP estimada de 7,29% (Codd et al., 2013). Ao avaliar o subgrupo de portadores de TB, Coutts et al. (2019) encontraram escore de risco poligênico (PRS) para 3634 SNPs com valor de $p < 0,013$. Essas variantes conseguiam predizer 4,38% da variância para TL relativo, ajustado para sexo, idade, IMC e uso corrente de lítio. O tratamento crônico com lítio (período igual ou superior a 4,5 anos) se associou a maior TL ($F(1, 75) = 4,733$; $p = 0,033$; variância explicada = 6,3%), fato que não ocorre em pacientes sem lítio ($F(1, 72) = 0,250$; $p = 0,619$; variância explicada = 0,3%) ou em uso de lítio há pouco tempo ($F(1, 75) = 0,85$; $p = 0,771$; variância explicada = 0,1%). Análise de enriquecimento de genes revelou 5 genes implicados na regulação do comprimento telomérico agrupados numa mesma região do cromossomo 3, dentre os quais LRRC34, TERT e NAF1. Análise de eQTL mostrou efeito do SNP mais significativo, rs10936599, na expressão do gene

LRRC34, localizado próximo a TERC, mas não na expressão de TERT, localizada em outro cromossomo.

A relação entre lítio e dinâmica telomérica parece depender do aumento da expressão de β-catenina, efetor central da via Wnt e substrato de GSK3B, o que promove aumento da expressão de hTERT. Resultados de experimentos *ex-vivo* tem corroborado essa hipótese (Bisland et al., 2009; Wei et al., 2015). Isto sugere que o efeito sobre a via Wnt/β-catenina pode responder pela ação neuroprotetora do lítio, independente de uma resposta clínica no TB. Com o encurtamento dos telômeros há redução da capacidade de ligação de shelterinas e da ativação de respostas de dano ao DNA. Como parte dessa cadeia há aumento na expressão de miR-34a que inibe a via Wnt reduzindo expressão de shelterinas (Fernandez III; Johson, 2018). Lítio normaliza a produção de shelterinas e aumenta hTERT por indução de β-catenina via inibição de GSK3. A região promotora de hTERT é regulada por diferentes fatores de transcrição que são substratos da via AKT1/GSK3B, como STAT3, c-Myc, NF-kB e p53 (Bisland et al., 2009), cuja expressão é regulada por lítio em culturas de células (Chuang et al., 2002).

Outros mecanismos podem mediar a relação entre lítio e TL, como a modulação das vias relacionadas ao estresse oxidativo, à estabilização da função mitocondrial e ao estresse imunoinflamatório. Embora ainda não se tenha estabelecido se o tamanho dos telômeros é um fator de risco ou uma consequência, há uma correlação inequívoca com os transtornos psiquiátricos.

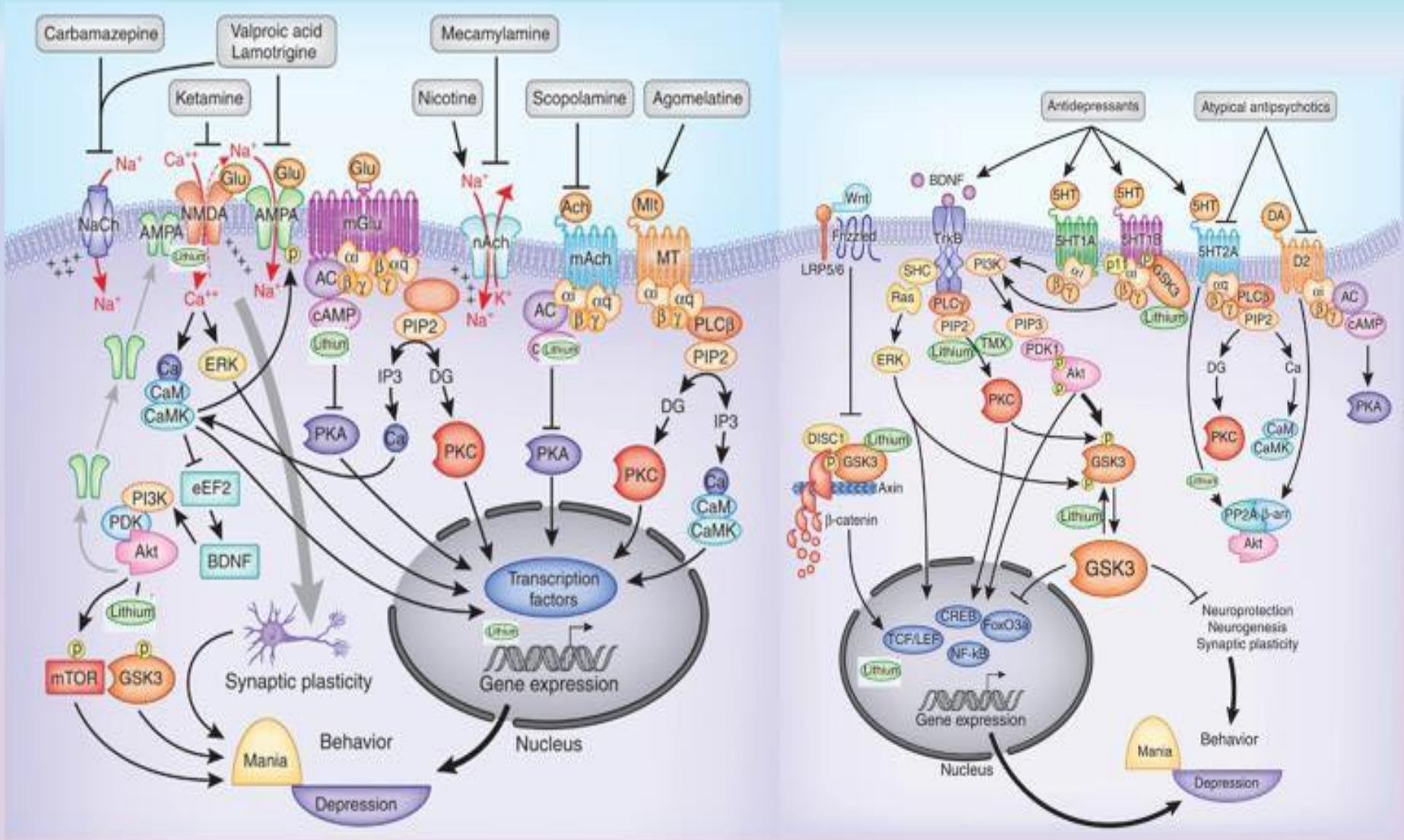

Figura 1. Vias de sinalização reguladas pela ação do lítio. Adaptação a partir de figuras obtidas na web.

2.5 Genética do lítio

Aspectos fundamentais associados à resposta estão relacionados a fisiopatologia da formação dos sintomas, que abrange desde alterações estruturais no DNA e suas implicações nas funções das proteínas transcritas a modificações na dinâmica do genoma a partir de perturbações externas ao meio celular. Essas alterações podem ser herdadas ou resultantes de mutações novas. O que se espera de uma droga eficaz é que ela reverta as modificações originadas por perturbações externas ao sistema. E isto pode ocorrer através da melhora ou restauração da função da proteína alterada ou através da ação sobre mecanismos de controle paralelos. Desse modo, é esperado que haja uma sobreposição entre genes associados à doença com genes associados ao fármaco usado para tratá-la.

Os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) têm norteado os estudos de associações de traços marcadores de fenótipos relativos à doença clínica e à resposta terapêutica (Kao et al., 2000; Stephens, 1999). Por definição, uma mudança de base na seqüência do genoma humano apenas pode ser considerada SNP caso esteja presente numa freqüência de no mínimo 1% na população. Outras variações estão presentes no DNA, como as inserções/deleções (InDel) e as variações de número de cópias de pequenas sequências de nucleotídeos (CNVs). Variações mais raras e mutações *de novo* também contribuem para o conjunto de efeitos determinantes de risco genético para o desenvolvimento das doencas complexas (McClellan; Susser et al., 2007). Há aproximadamente 84,7 milhões desses SNPs distribuídos entre os 3 bilhões

de pares de bases do DNA humano (Abecasis; Auton et al., 2012). Destes, cerca de 300 a 600 mil correspondem a *tag*-SNPs, indentificadores das possíveis combinações dessas variantes segregadas em conjunto (*International HapMap 3 Consortium*, Altshuler et al. 2010). Cerca de 54% dos SNPs estão localizados em regiões codificadadoras de genes. Placas (*arrays*) desses SNPs possibilitaram ampliar a investigação de associações entre variações estruturais e diferentes fenótipos. Estima-se que os indivíduos diferem entre si numa freqüência de uma vez a cada 300 a 1000 nucleotídios do genoma (Lander et al.,2001).

Farmacogenômica procura investigar como o perfil genético individual influencia a reação a medicações. Também avalia como variações no DNA interagem com estímulos ambientais na influência da resposta às drogas. No contexto clínico, essas informações têm o objetivo de melhorar as decisões em relação ao tratamento dos pacientes visando um melhor prognóstico. Apesar de todas as associações com características clínicas, demográficas e com marcadores biológicos reveladas até o momento, nenhum algoritmo com bom valor preditivo foi estabelecido. O mesmo se aplica à previsibilidade de desenvolvimento de efeitos colaterais. A decisão clínica portanto ainda está muito amparada na experiência e julgamento subjetivo do médico e numa estratégia de “tentativa e erro” informada.

Há fortes evidências que fatores genéticos influenciam a eficácia da profilaxia com lítio nos transtornos afetivos. A influência potencial de fatores genéticos é demonstrada por diversos estudos que revelam resposta similar ao tratamento, bem como o advento de efeitos colaterais. A melhor resposta em gêmeos monozigóticos ou parentes de primeiro grau se relaciona à boa resposta

em probandos (Vojvoda et al., 1996; Mata et al., 2001; Muller et al., 2001; Grof et al., 2002; Wehmeier et al., 2005; Duffy et al., 2017).

Grof et al. (2000) encontraram boa resposta em 67% dos parentes de bons respondedores ao lítio, comparado a 30% no grupo controle. Relata-se também maior prevalência de TB em famílias de bons respondedores, enquanto em família de não respondedores a prevalência de Esquizofrenia é maior (GROF et al., 1994; ALDA et al., 1999). Não se identifica um padrão de herança definido nestes casos, em grande parte devido às dificuldades em avaliar a resposta em várias gerações, à baixa confiabilidade das informações acerca da qualidade da resposta terapêutica e à heterogeneidade da própria doença. Estima-se por exemplo que os polimorfismos genéticos respondam por mais de 50% da resposta a antidepressivos (Porcceli et al., 2011), fato que deve ser semelhante para o lítio.

As estratégias iniciais de investigação do substrato genético responsável pela heterogeneidade de resposta terapêtica se basearam em genes candidatos. No caso do lítio, sua farmacocinética é relativamente simples e não envolve enzimas metabolizadoras, o que permite direcionar o interesse aos seus aspectos farmacodinâmicos.

Desta forma, a maioria dos estudos nesse campo se baseia na estratégia de busca de associações entre resposta de longo prazo e variações estruturais em genes candidatos. Os genes selecionados são aqueles pertencentes a neurobiologia do TB e ligados aos mecanismos conhecidos de ação do lítio. Os estudos de associação privilegiaram assim genes associados à neurotransmissão (receptores de serotonina, dopamina e glutamato), a vias de

sinalização intracelular (fosfatidil-inositol, cAMP e a vias ligadas a proteínas kinases), à neuroproteção (BDNF e GSK3β) e a ritmos circadianos, além de uma miscelânea de outros genes. Diferentes grupos utilizando critérios de resposta diversos obtiveram associações positivas com alguns alelos. Chama atenção, pela replicação dos resultados, associações com variantes tipo SNP de GSK3B, BDNF e InDel na região promotora de SLC6A4 (5HTTLPR). A tabela 1 compila os achados positvos encontrados até o momento.

Raríssimos estudos exploraram a relação farmacogenética com outros estabilizadores de humor. Um estudo de eficácia ao valproato sugeriu associação com XBP1 (Rybakowski, 2013).

Em função da importância clínica da descoberta de marcadores genéticos para resposta terapêutica, inúmeros grupos independentes se uniram em consórcio, o *International Consortium on Lithium Genetics* - ConLi^{+}Gen (www.conligen.org), com intuito de conferir maior poder de detecção das variáveis genéticas associadas a eficácia do lítio utilizando-se de sequenciamento amplo do genoma. Vantagem dessa colaboração internacional se estende para a padronização da coleta de dados ao estabelecer um fenótipo de resposta elaborado para contemplar tanto critérios dicotômicos quanto contínuos de resposta (escala de ALDA).

Esses consórcios favoreceram estudos de associação com sequenciamento amplo do genoma (GWAS). Essa abordagem busca identificar diferenças significativas de variantes comuns, com MAF > 5% entre grupos casos e controles em grandes amostras (Golub, 2010; Liu et al., 2013). Surgiram desses estudos potenciais novos genes como receptores glutamatérgicos

(GRIA2, GRIA4), canais iônicos e transportadores de membrana (ACCN1, SLC4A10), além de proteínas de membrana (ANK3, ODZ4) (Rybakowski, 2013). Entram nessa lista fatores de crescimento como IGF-1 (Milanesi, 2015), receptores de fatores de controle metabólico como leptina (Lee et al., 2015), proteínas reguladoras de foslipídes como SESTD1 (Song et al., 2016) e genes codificastes de proteínas reguladoras do ciclo circadiano como PGC-1α e RORA (Geoffroy et al., 2016). SNPs associados a RNAs não codificantes longos (AL157359.3 e AL157359.4) também emergiram como potenciais marcadores de resposta através de GWAS (Hou et al., 2016).

A melhor maneira de estabelecer a resposta a qualquer droga é através de estudos prospectivos controlados. Entretanto, custos imensos e o longo tempo de seguimento necessário para acessar a resposta ao tratamento de transtornos psiquiátricos tornam inviável essa abordagem em nosso meio. Deste modo, estudos que avaliam retrospectivamente a resposta clínica são preferidos por serem factíveis. O prejuízo da confiabilidade na coleta de dados pode ser em parte compensado pelo acesso a fichas de evolução, pelo estabelecimento de critérios de resposta ponderados por demais variáveis clínicas e ambientais. Na tentativa de ultrapassar esses obstáculos um estudo prospectivo multicêntrico (*Pharmacogenomics of Bipolar Disorder*) seguindo 700 pacientes por 2 anos foi lançaddo recentemente (Oedegaard et al., 2016). A recorrência de episódio de humor será o evento definidor de resposta.

Os estudos de associação necessitam de um grande número de amostras para a identificação de variantes de risco da doença em questão. O cálculo amostral para a detecção de associações é conhecido por ser altamente afetado pela prevalência da doença, frequência alélica, desequilíbrio de ligação (DL),

modelos de herança e tamanho do efeito das variantes genéticas (como por exemplo, *odds ratio*, risco relativo, etc.) (Gordon et al., 2003; Pfeiffer; Gail, 2003; Scherag et al., 2003). Entretanto, à medida que o tamanho da amostra aumenta e, por consequência, uma maior quantidade de dados é assimilada para análise combinada, o risco de associações espúrias devido à subestruturação populacional ou estratificação também aumenta (Devlin et al., 2001). Outra questão fundamental, que ocorre ao aumentarmos o número amostral e que pode contribuir para resultados com falsos positivos assim como com falsos negativos em GWAS é a variabilidade fenotípica que passa a existir dentro de grandes populações. Isto em parte explica por que os GWAS até o momento não trouxeram grandes achados. As suas limitações parecem não os tornar superiores aos estudos de genes candidatos.

2.6 Epigenética do lítio

Epigenética se refere aos mecanismos reguladores da expressão gênica, os quais são influenciados por diversos fatores, tais como idade, estilo de vida e variações ambientais, além das alterações fisiológicas que ocorrem na doença. Juntamente com a variação estrutural do DNA, assume papel determinante na variabilidade e complexidade de fenótipos, que se estendem da normalidade ao estado mórbido. Os mecanismos epigenéticos são importantes meios de modulação ambiental do DNA, representando o elo entre os estímulos externos e a resposta genômica.

Essenciais na diferenciação celular, no desenvolvimento e na transmissão

de informações entre gerações, os mecanismos epigenéticos guardam a possibilidade de facilitar o surgimento de doenças em suas diversas expressões e gravidade. Alterações no controle epigenético da homeostase celular podem levar ao desencadeamento de câncer, doenças auto-imunes, doenças metabólicas e transtornos neuropsiquiátricos. Esses mecanismos epigenéticos respondem portanto pela influência do ambiente sobre o genoma, incluindo o efeito de fármacos (Kubota et al., 2012). O conjunto de sistemas envolvidos na modulação epigenética do genoma incluem metilação do DNA, modificação de histona, atuação de RNA não codificante (ncRNA) e remodelagem da cromatina.

O processo de metilação ocorre pela adição de um grupo metil (CH3) no carbono 5 dos nucleotídios citosina ao longo de um segmento do DNA, o que resulta num complexo 5-metilcitosina (5-mC). Nas células somáticas a metilação ocorre nas regiões cromossômicas em que há agrupamento de dinucleotídios citosina-guanina (“ilhas” CpG). Em humanos, 5-mC é encontrado em aproximadamente 1,5% do DNA genômico e as ilhas CpG estão associadas a cerca de 60% dos promotores dos genes. A família de enzimas DNA-metiltransferases controlam a adição do grupo metil à citosina. Isto permite a manutenção de padrão específico dos diferentes tecidos, confere estabilidade e integridade cromossômica e em geral inibe a transcrição gênica.

A cromatina é formada através do adensamento do DNA em torno de proteínas nucleares, as histonas. Quanto mais condensada a cromatina maior a dificuldade de acesso ao DNA pelos fatores associados à transcrição. A estrutura da cromatina pode ser alterada por modificações das histonas, o que permite ativação ou repressão da transcrição, além de reparos no DNA. As histonas podem sofrer várias modificações pós-tradução, além de metilação/desmetilação

e acetilação/desacetilação, com repercussão sobre sua interação com o DNA e outras proteínas nucleares.

RNAs não codificantes (ncRNA) são moléculas funcionais de RNA transcritas mas que não traduzem proteínas. Esses RNAs regulam a expressão gênica através de vários mecanismos que incluem modificações no RNA ribossomal, repressão da expressão de RNA mensageiro (mRNA) via interferência sobre o próprio RNA, regulação de *splicing* alternativo e mediação de interações RNA-RNA. A maioria dos transcritos não codificantes são RNAs longos (lncRNA). Um subgrupo em particular, *large intergenic non-coding* RNA (lincRNA) formam complexos direcionados a regiões genômicas específicas regulando estados epigenéticos específicos.

Os micro-RNAs (miRNA), fragmentos de ncRNA com comprimento em torno de 22 nucleotídios se ligam a sítios específicos do RNA mensageiro para induzir degradação ou bloquear tradução. Sua ação pode ocorrer em conjunto com a metilação. Eles têm se mostrado grandes reguladores da plasticidade neuronal e funcionamento cerebral (Schratt, 2009). Sua ação sobre o RNA pode ocorrer de forma coordenada e assim regular todo o genoma (Hussain, 2012).

Alterações epigenéticas também podem afetar a resposta ao tratamento farmacológico ao modular os genes envolvidos no farmacocinética e farmacodinâmica das drogas. Os fármacos também alteram diretamente o perfil de metilação de promotores de genes e a acetilação de histonas, regulando assim a transcrição do DNA (Ivanov et al., 2012). Isto contribuiria para a variação interindividual na resposta e para a perda de eficácia terapêutica ao longo do tempo. Utilizados como marcadores, esses mecanismos podem servir para

monitorar o tratamento e estabelecer prognóstico clínico.

A farmacoepigenética tem buscado integrar os elementos dinâmicos do genoma à avaliação de eficácia terapêutica. Fortes evidências vindas de estudos animais e em humanos indicam que antidepressivos, antipsicóticos, ácido valpróico e lítio alteram a regulação epigenética de uma variedade de genes (Boks et al., 2012). Associações mais específicas têm sido apontadas recentemente. Higgens et al. (2015), por exemplo, apresentaram uma análise *in silico* combinando resultados de diferentes estudos genéticos e epigenéticos sobre resposta ao lítio, inlcuindo SNP que não apresentaram significância em GWAS em que identificaram uma rede associada a receptores de glutamato tipo AMPA mediando essa resposta.

Recentemente, a detecção de pequenas cadeias de RNA não codificante, os micro-RNAs (miRNAs), como grandes reguladores da expressão gênica chamou atenção para o seu papel nas doenças complexas. Vários deles têm sido associados com a ação de psicotrópicos, como mir-132 e mir-16, os quais exercem funções críticas em circuitos ligados à plasticidade sináptica e a receptores de neurotransmissores. Em GWAS realizado pelo ConLi^{+}Gen foram revelados 106 miRNAs com significância nominal em associação com resposta ao lítio num modelo de resposta contínua e 71 miRNAs num modelo dicotômico (Consortium on Lithium Genetics; Reinhold et al., 2018). miR-633, localizada em região intergênica do cromossomo 17, e miR-607, localizada em região intergênica do cromossomo 10, apresentaram as mais fortes associações (p = 9,80E-04 e p = 5,69E-04, respectivamente). Atribui-se a ausência de resultado significativo possivelmente ao pequeno tamanho da amostra (n = 1563). Embora esse estudo não tenha conseguido identificar miR-eQTLs, encontrou-se um

enriquecimento para SNPs cis-miR-eQTL frente aos achados de Huan et al. (2015). Esse grupo de pesquisa mostrou evidências de 5269 cis-miR-eQTLs para 76 microRNAs, os quais não estavam entre os achados com significância nominal no estudo do Conli^{+}Gen. Entretanto, um locus contendo 2 lncRNA se associou signficativamente à resposta ao lítio em outro estudo do ConLi^{+}Gen (Hou et al., 2016).

Ácido valpróico e butirato de sódio são drogas inibidoras das desacetilases de histonas. Estudos apontam para potencialização à resposta a antipsicóticos em associação com inibidores de desacetilases (Montalvo-Ortiz et al., 2014; Fass et al., 2014; Brami-Cherrier et al., 2014). Inibição da enzima metiltransferase (DNMT) ocorre sob influência de psicofármacos, facilitando efeito terapêutico pela modulação do nível de metilação em regiões promotoras de genes de receptores de neurotransmissores glutamatérgicos e gabaérgicos, de BDNF, Reelina e GAD67, os quais estão hipermetilados em modelos de psicose (Shimabukuro et al., 2006; Dong et al., 2009; Guidotti; Grayson, 2014).

Exemplo da importância da integração do genoma é a significativa interação entre as funções do BDNF e 5-HT nos transtornos de humor. A transcrição desses elementos está submetida a alterações epigenéticas desencadeadas por estímulos estressantes. A variante curta de 5-HTTLPR e a variante BDNF-Met são formas predisponentes a alterações epigenéticas e tanto o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal quanto CREB estão envolvidos na interação epistática entre estes polimorfismos (Ignacio et al., 2014).

Tabela 1. Genes/*Loci* e SNPs/InDel associados à resposta profilática ao lítio em estudos de genes candidatos e GWAS.

Gene/Locus	**Popução e Método**	**Alelos investigados**	**Achados**	**Referência**
INPP1	TB (n=23) vs. Controles (n=20)	rs (C973A)	Alelo C mais frequente em respondedores	Steen et al. 1998
	TB + ESQAF (n= 184)	rs2064721	Melhor resposta em portadores de PTSD	Bremer et al., 2007
	TB (n = 131)	rs909270	Melhor resposta com alelo G	Mitjans et al. 2015
PLCG1	TB - excelentes respondedores (n = 136) vs Controles saudáveis (163)	[CA]n, intron	Melhor resposta e alelo [CA]5	Turecki et al., 1998
TPH1	TB (n=90) vs. DM (n=18)	rs1800532 (218A/C), intron 7	Tendêndia a melhor resposta com genótipo A/A (não significativo)	Serreti et al. 1999
5HTTLPR	TB (n=67)	InDel	Frequência maior de l/l em maus respondedores	Del Zompo et al. 1999

	BD (n=167), MDD (n=34)	InDel	Pior resposta com alelo s	Serreti et al. 2001
	BD (=83)	InDel	Bom resposta com genotipo l/s	Serretti et al., 2004
	TB (n=67)	InDel	Pior resposta com alelo s	Rybakowski et al. 2005a
18q23	BD (n=18), estudo de haplótipo	N/A		Ewald et al. 1999 *população com efeito fundador
7q11.2; 15q14	BD (n=31), sequenciamento genômico			Turecki et al. 2001
mtDNA	BD (n=54)	10398A/G	Melhor resposta com alelo 10398A	Washizuka et al. 2003
BDNF	TB (n=88)	rs6265 (Val/Met)	Melhor resposta com Met	Rybakowski 2005b
	TB (n=108)	rs6265, rs988748	——	Dmitrzak-Weglarz et al., 2008

	TB (n=342)	rs6265	Resposta dependente do subtipo de TB: melhor em TB tipo II com Val/Val; melhor em TB tipo I com Met	Wang et al., 2012 *Han
GSK3B	TB (n=88)	rs334558 (−50T/C)	Melhor resposta com alelo C	Benedetti et al., 2005
	TB + MD (n=81)	rs334558	Melhor resposta com alelo C para potencialização de antidepressivo	Adli et al., 2007
	TB + ESQAF (n= 184)	rs2199503	Melhor resposta em portadores de PTSD	Bremer et al., 2007
	TB (n = 138)	rs4558	Pior resposta com genótipo T/T	Lin et al., 2013
	TB (n=100)	rs1732170, rs11921360, rs334558	Pior resposta com alelo A (rs11921360); haplótipo CCA mais frequente em bons respondedores	Altınbaş et al. 2017
	TB (n = 42) Haplótipo	rs334558, rs3755557 (-1727A/T)	Boa resposta e haplótipo TA; pior resposta e haplótipo CA	Iwahashi et al, 2014
	TB (n = 131)	rs1732170, rs11921360, rs334558		Mitjans et al. 2015

	TB (n = 282)	rs6438552	Tendência a melhor resposta com genótipo C/C (não significativo)	McCarthy et al., 2011
IMPA2	Trios (n=116)	rs3786282	Tendência a melhor resposta para genótipo GA (não significativo)	Dimitrova et al., 2005
	TB (n = 131)	rs669838	Boa resposta com alelo C	Mitjans et al. 2015
XBP-1	TB (n=66)	rs2269577 (-116C/G)	Melhor resposta para alelo C	Masui et al. 2006a *japonês
BCR	TB (n = 136)	rs140504	Pior resposta com alelo Ser796	Masui et al., 2006b
NTRK2	TB()n = 184)	rs1387923, rs1565445	Boa resposta com PTSD e ideação suicida	Bremer et al., 2007
	TB (n=279)	rs2769605	Pior resposta para genótipo G/G	Wang et al., 2013 *Han

5HTTLPR/BDNF	TB (n=111)	rs4680 (BDNF)	Pior resposta (70% probabilidade) com alelo s e genótipo Val/Val do BDNF	Rybakowski et al. 2007
CACNG2	BD (n=35) + Esquizofrenia (n=35) vs. Controles (n=35)	rs2284017, rs5750285	Boa resposta para genótipos C/C de ambos alelos	Silberberg et al. 2008
	TB (n = 286) prospectivo/retrospectivo	rs2283967, rs140040	-	Miranda et al., 2019
CREB1	TB (n=258)	rs2551640, rs 208254857	Melhor resposta para o genótipo GA (rs2551640) e pior resposta para alelo T (rs208254857)	Mandani et al., 2008
3p22; 4q32 (GRIA2); 8q22; 11q14; 15q26	BD (n=359), GWAS			Perlis et al. 2009
DRD1	TB (n=92)	rs4532 (-48A/G)	Menor frequência de genótipo G/G em respondedores excelentes	Rybakowski et al., 2009

FYN	TB (n=101)	rs3730353	Tendência de pior resposta com alelo T (não significativo)	Szczepankiewicz et al. (2009a)
NR1D1 (Rev-Erb-α)	TB (=170)	Rs2314339	Pior resposta com alelo T	Campos-de-Souza et al., 2010
	TB (n=282)	rs2071427	Pior resposta com alelo G	McCarthy et al., 2011
COMT	TB (n=144)	Rs4680 (Val108Met)	Pior resposta com genótipo Met/Met	Lee et al., 2010
ACCN1	BD (n=204), GWAS	rs11869731	Melhor resposta com genótipo G/G	Squassina et al. 2011
CRY1	TB (n=282)	rs8192440	Melhor resposta com alelo G	McCarthy et al., 2011
GR	TB (n = 115)	rs6198, rs6191, rs6196, rs258813, rs33388	Pior resposta com haplótipo TAAGA	Szczepankiewicz et al., 2011
GADL1	BD (n=294), GWAS	rs17026688, rs17026651	Melhor resposta com alelo T (rs17026688) e alelo G (rs17026651)	Chen et al. 2014 *Han

5HTTLPR/STin2	TB (= 122)	VNTR (STin2)	Pior resposta com combinaçao de alelos s (5TTLPR e 10 (STin2)	Tharoor et al., 2013
SESTD1	TB (n = 1591) GWAS	rs116323614	Melhor resposta com alelo A	Song et al., 2016
AL157359.3 (lncRNA)	TB (n = 2935) GWAS	rs79663003, rs78015114	Melhor resposta para alelos G e T	Hou et al., 2016 (ConLiGen)
AL157359.4 (lncRNA)	TB (n = 2935) GWAS	rs74795342, rs75222709	Melhor resposta para alelos T e T	Hou et al., 2016 (ConLiGen)
RORA	TB (n = 223)	rs17204573	—	Geoffroy et al., 2016
PPARGC1A (PGC-1α)	TB (n = 223)	rs10517026	—	Geoffroy et al., 2016
ACP1	TB (n = 93)	rs300774	—	Szczepankiewicz et al., 2018

FKBP5	TB (n = 93)	rs9296158, rs7748266, rs1360780, rs9394309	Pior resposta com haplótipo ATTG	Szczepankiewicz et al., 2018
GLCC1	TB (n = 93)	rs37972	Pior resposta com alelo C	Szczepankiewicz et al., 2018
Sistema HLA, TNF, IL-4, INFgama (*FAM177A1, ADCY1, HLA-DMA, HCG4, CCNH, MAIP1, ZNF804A, FAM178B, ERCC4, ADAMTSL3, MYO1H, GRAMD1B, EPHX2, HCG4, CMAHP, MEF2C)*	TB I e II (n = 2586)	rs79403677, rs1521470, rs209474, rs144373461, rs3919583, rs7588746, rs62200793, rs6728642, rs7405404, rs66486766, rs7959663, rs61123830, rs59724122, rs142425863, rs6942227, rs324899	PRS para Esquizofrenia foi associada a pior resposta ao lítio	Amare et al., 2018 (ConLi^{+}Gen)

2.7 Integração de dados biológicos

As redes de integração molecular que ocorrem nas células se organizam conforme alguns princípios. Neste contexto celular global existem sub-redes distintas que caracterizam fenótipos e vias de resposta a perturbações externas ao sistema, como estímulos físicos e químicos. As redes biológicas possuem poucos nodos altamente conectados, chamados *hubs*. Proteínas que representam esses hubs tendem a ser codificadas por genes essenciais comparativamente aqueles associados a proteínas da periferia da rede. Assim, mutações em genes associados aos hubs terão grande e ampla repercussão no sistema. Estes genes portanto estariam mais associados a doenças. Por outro lado, genes essenciais que constituem hubs centrais quando mutados tendem a ser eliminados precocemente. Genes não essenciais tendem a ser tecido específicos e localizados na periferia do interactoma. Genes associados a um fenótipo tendem a ser vizinhos, portanto organizados localmente numa rede biológica em “módulos de doença”. A doença seria então ocasionada pela disfunção de elementos constituintes desses módulos, os quais podem ter regiões compartilhadas com outros módulos de diferentes doenças. Decorre disso que mutações diversas e independentes em proteínas que interagem levam a fenótipos similares. Ou que a função de um modulo repercute em módulos vizinhos ou ainda que uma mutação pode ser compartilhada por diferentes módulos de funcionais ou de doença, o que possibilita a frequente comorbidade e fenômenos como pleiotropia e epistasia (Guney; Oliva, 2014). O surgimento da doença passa a depender de um mecanismo combinatório em que diferentes defeitos ou perturbações em diferentes elementos pertencentes

ao modulo resultam em fenótipo semelhante pois alteram a função do modulo. Este modulo inclui genes modificadores da doença, que medeiam fenômenos epigenéticos, transcricionais e pós-transcricionais. As drogas direcionadas a um alvo específico podem corrigir aspectos disfuncionais de um módulo de doença mas ao mesmo tempo desencadear outros efeitos indesejáveis pela expansão da perturbação ao longo da rede. Isto implica a necessidade de terapêuticas dirigidas a múltiplos alvos, levando em consideração o fenótipo de resposta a fármacos que pode ser determinado por módulos diversas do caracterizador de doença, embora intuitivamente deva compartilhar de seus elementos e principalmente de elementos vizinhos. Neste aspecto, lítio é uma droga paradigmática. Sua potencial ação em múltiplos sítios, modulando diversos fenótipos, se expande para além de módulos funcionais associados ao transtorno de humor.

Higgins et al. (2015) utilizaram análise de redes de genes apontados por diferentes estudos e obtiveram uma rede de genes e seus SNPs relevantes formando uma via de regulação glutamatérgica associada a boa resposta ao lítio. Poderíamos considerar ainda que dependendo da divisão funcional da rede molecular associada ao TB, o sítio poderia ser eficaz na restauração de funcionalidade de apenas um sub-módulo dentre os vários que compõem a rede desse transtorno, como por exemplo ser eficaz na sub-rede associada à mania, mas não na sub-rede associada à depressão, ou na sub-rede associada ao suicídio, E quanto mais alterações houver em redes e módulos vizinhos maior a dificuldade para seu efeito adequado. Portanto, organizar o conhecimento das interações moleculares associadas a doença e identificar as relacionadas a potenciais sítios corretores da disfunção através da utilização das propriedades

dos grafos, ajudará a estabelecer melhor a rede de genes que de fato importa para a disfunção e subsequente regularização do sistema. Portanto, a genética das doenças complexas como TB e sua terapêutica medicamentosa deve ser melhor avaliada aplicando-se as propriedades dos grafos. Conforme caracterizam Barabási al. (2011), nestas análises observam-se poucos hubs altamente conectados sustentando a rede unida; fenômeno de "*small-world*" em que a maior parte dos nodos representativos de proteínas estão a poucos passos de qualquer outro, o que revela uma interação funcional muito próxima; presença maior ou menor que esperada de motivos, que são sub-redes associadas a alguma função biológica mais especifica dentro da rede, como alças regulatórias; presença de nodos com alta medida de centralidade de intermediação.

O mecanismo terapêutico particularmente pode envolver vias contra-regulatórias de feedback e estar sujeito a mudanças de acordo com a progressão da doença, adaptação da expressão gênica a estímulos perturbadores ambientais e remodelação celular, sendo bastante dinâmico (Danho, 2016). Deste modo, predição de resposta implica a existência de um tempo de validade. Incluir estes aspectos em modelos de rede será necessário mas apenas possível na medida em que se consiga quantificação seriada de biomarcadores.

Outra questão a ser considerada é a expressão gênica diferencial entre tecidos. As regiões cerebrais diferem entre si nas redes de proteínas por necessitarem de especificidade funcional, o que o que determina diferenças na constituição das redes e na importância e posicionamento de seus nodos. Isto implica a ação diferenciada dos fármacos em cada tipo celular, possivelmente associada a sítios diferentes de ligação dentro de novas redes funcionais (Kitsak

et al., 2016).

Diversos bancos de dados disponíveis online permitem comparações e explorações topológicas para genes de interesse ou resultantes de grandes bibliotecas fornecidas por sequenciamentos utilizando HTS (*high throughput sequencing*). A utilização desses bancos anotados e curados constantemente permite dar consistência maior às hipóteses *a priori* quando se utilizada alguns genes e variantes candidatos. Alguns programas integram bibliotecas de diferentes fontes, todavia alguns parecem mais "amigáveis". STRING (www.string.org) é um dos mais utilizados na avaliação de redes de interação proteína-proteína (PPI). A plataforma, resultado de um consórcio europeu, constrói a rede PPI a partir de dados experimentais e preditivos e faz algumas análises topológicas considerando interações físicas e funcionais (Szklarczyk et al., 2019). Importante notar que interações protéicas não significam interações gênicas, embora sejam um reflexo da importância dos genes relacionados na forma de proteínas para determinadas funções moleculares. NetworkAnalyst (www.networkanalyst.ca), patrocinado pela Universidade de McGill, possibilita além da análise de PPI a integração de dados de expressão gênica. Nesta plataforma é possível analisar redes PPI em tecidos específicos, analisar redes de interação entre genes e fatores de transcrição, entre drogas e proteínas, entre genes e doenças e analisar co-expressão de genes (Zhou et al., 2019).

Através de redes PPI é possível entender o modo como ocorre a conexão entre cada gene/proteína. Medidas de centralidadede de grau, que reflete a probabilidade de receber uma conexão, centralidade de proximidade, que reflete o caminho mais curto a se percorrer entre nodos, centralidade de intermediação,

reflete o número de vezes que o nodo age como ponte ao longo do caminho mais curto entre dois outros nodos, indicam a importância de cada elemento da rede em relação aos demais e o quanto estão conectados. Proteínas e genes centrais na rede, muito conectados ou com alta centralidade de intermediação, quando removidos ou disfuncionais vão refletir em todo o sistema, com menor possibilidade de compensações por alças de *feedback* (Bertolazzi et al., 2013).

Esses programas também avaliam a associação do conjunto de proteínas com processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares utilizando um agrupamento de classes conforme relações ontológicas caracterizadas como *Gene Ontology* (GO). Os programas também permitem visualizar a rede formada a partir das sementes, revelando a disposição espacial da rede PPI e possíveis agrupamentos. A disposição dos genes reflete o grau de conectividade de cada um na rede. Genes/Proteínas muito conectados (Hubs) quando disfuncionais ou mutados em geral estão associados a doenças com repercussões clínicas importantes e com apresentação heterogênica.

A rede de interação de proteínas representada pelos genes considerados neste estudo demonstra algumas propriedades que refletem concordância com as observações e conclusões dos estudos em doenças complexas e sistemas dinâmicos até o momento.

Embora tenham proporcionado avanço espetacular na integração de dados, importantes questões acerca das relações funcionais determinado expressão, efeitos epigenéticos, controle pós-transducional e interação com reguloma devem ser consideradas nas interpretações de resultados. O que parece relevante é a compreensão da importância das relações entre

genes/proteínas estudas e suas relações com os demais elementos da rede. Novos genes podem ser incorporados a vias moleculares e módulos de doença, bem como novos candidatos até então desprezados, ou periféricos na rede, podem ser investigados em seu efeito sobre um fenótipo estudado.

Partindo desta perspectiva, inúmeros outros potenciais sítios sob influência direta ou indireta de proteínas e genes associados ao mecanismo de ação do lítio podem se relacionar geneticamente a sua ação terapêutica.

3 Objetivos

Propõe-se avaliar a associação de resposta terapêutica de longo prazo ao lítio em portadores de TB tipo I e interação entre perfil de metilação e SNPs de genes envolvidos nos mecanismos de ação desse fármaco - GSK3B, AKT1, MTOR - e os principais ativadores de transcrição associados a estas vias - BDNF, BCL2. Será tentado, sempre que o tamanho da amostra permitir, estratificar os pacientes em função de características clínicas, como presença de sintomas psicóticos, tentativa de suicídio, história de transtorno psiquiátrico em familiares, padrão de ciclagem, comorbidade com uso de substâncias e comorbidades clínicas.

Serão consideradas as seguintes hipóteses:

1) H_0 = a resposta ao tratamento com lítio em portadores de TB tipo I não se associa a variantes estruturais de genes avaliados.
2) H_0 = a resposta ao tratamento com lítio em portadores de TB tipo I não se associa ao perfil de metilação em sítios de regiões promotoras de genes avaliados.
3) H_0 = a resposta ao tratamento com lítio em portadores de TB tipo I não se associa à interação do perfil de metilação em sítios de regiões promotoras com SNPs dos genes avaliados.

Concomitantemente, será avaliado o comprimento de telômeros nesta população e testadas as hipóteses de associação:

1) H_0 = a resposta ao tratamento com lítio em portadores de TB tipo I não se associa a comprimento de telômeros.

2) H_0 = o comprimento dos telômeros não se associa a variantes polimórficas.
3) H_0 = o comprimento dos telômeros não se associa ao perfil de metilação em sítios de regiões promotoras com SNPs dos genes avaliados.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Um total de 329 indivíduos não aparentados com diagnóstico de TB do tipo I, cujos dados retrospectivos de seguimento clínico pudessem ser acessados, foram recrutados a partir de 4 locais diferentes onde realizaram tratamento: Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP, Centro de Atenção Integrada em Saúde Mental da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Hospital João Evangelista e consultórios particulares.

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP aprovou este protocolo de pesquisa, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ver anexos B e C). Todos os participantes do estudo consentiram em doar as amostras de sangue após assinatura do referido termo.

Por ser um estudo retrospectivo, as informações que permitiram avaliar a resposta foram extraídas principalmente de prontuários médicos, e, quando possível, checadas com o paciente e familiares.

Após extensa avalição dos dados de prontuário e entrevistas clínicas, foram excluídos das análises os casos em que havia inconsistência diagnóstica, tempo de seguimento abaixo de 2 anos e ausência de dados suficientes para caracterizar resposta ao tratamento, restaram 213 indivíduos. Em poucos casos (N=13) em que o acesso a prontuários prévios não foi possível optou-se por

mantê-los no estudo em virtude do relato individual e familiar confiável da excelente resposta ao lítio.

4.2 Avaliação de resposta ao lítio

Para quantificação da resposta aplicou-se a “escala de Alda” – Critérios Retrospectivos da Resposta Terapêutica de Longo Prazo em Pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar (ver anexo 1). Para as análises foram considerados os escores totais, os escores dos critérios A isoladamente (N = 213), os escores totais (N = 213), os escores totais excluindo-se aqueles em que o escore dos critérios B somavam 4 ou mais (N=108). Para as análises também se dividiu a amostra em 3 grupos de resposta: respondedores (R: Alda ≥ 7), respondedores parciais (RP: 3 ≥ Alda < 7) e não respondedores (NR: Alda < 3).

O doutorando obteve treinamento no preenchimento da escala com o ConLi^{+}Gen, através do acesso a vinhetas clínicas e seu desempenho ficou no intervalo de confiança obtido nos testes de confiabilidade entre avaliadores.

Dados sócio-demográficos e parâmetros clínicos foram coletados conforme disponibilidade. As análises de associação com essas variáveis foram realizadas então para subgrupos para os quais existiam os dados pertinentes.

4.3 Escolha dos genes e variantes para investigação

Baseado nos achados de literatura médico-científica em relação aos mecanismos de ação do lítio e à associação prévia de variantes gênicas com resposta a longo prazo, foram escolhidos marcadores já associados positivamente à resposta ao lítio, a antidepressivos e a antipsicóticos, e marcadores ainda não explorados em relação a TB e sua terapêutica mas com potencial de modular cascatas de sinalização molecular associadas aos processos metabólicos, imunoinflamatórios e neuroplasticidade.

Foi então definida uma pequena rede com bom coeficiente de agrupamento, refletindo interação entre as proteínas codificadas pelos genes AKT1, GSK3B, MTOR, BDNF, BCL2 e SLC1A2.

Para o gene AKT1 foram selecionadas as seguintes variantes:

a) rs1130214 – apresenta influência sobre atividade enzimática (McGuire et al., 2017); foi encontrada em associação com aumento do risco de comportamento suicida em TB (Magno et al., 2010); foi associada com esquizofrenia (Mathur et al., 2010) e cognição (Pietiläinen et al., 2009); foi associada a resposta a antidepressivos em DM (Losenkov et al., 2015); associada a ocorrência de sintomas extrapiramidais induzidos por antipsicóticos (Cassó e al., 2014).

b) rs2494732 – fator de risco para psicose induzida por cannabis (Morgan et al., 2016); associação com sintomas psicóticos em TB e Esquizofrenia

(Karege et al., 2012); associação com resposta a risperidona em Esquizofrenia (Ikeda et al., 2008).

c) rs2498786 – associação como Doença de Alzheimer em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (Liu et al., 2015).

d) rs3730358 – associação com Discinesia Tardia em interação com D2 (Zai et al., 2008); associação com início tardio de DM (Pereira et al., 2014; associação com expressão protéica (McGuire et al., 2017).

Para o gene GSK3B foram definidas as seguintes variantes para estudo:

a) rs334558 – associação com TB de início tardio (Benedetti et al., 2004); associação com resposta ao lítio (Rybakowsky, 2014); associação com remissão em DM (Levchenko et al., 2018);

b) rs1732170 – associação com resposta ao lítio (Mitjans et al., 2015); associação com impulsividade em TB (Jiménez et al., 2014); associação com tentativa de suicídio em TB (Jiménez et al., 2013).

c) rs3755556 - sítio de ligação do fator de transcrição IRF1, associado à regulação de genes ligados a resposta mediada por interferon e prostaglandinas (Yen et al., 2015).

Embora MTOR interaja proximamente a AKT1 e GSK3 na sinalização dopaminérgicas e na mediação de sintomas extrapiramidais de antipsicóticos, suas variantes estruturais não foram exploradas em associação com TB, Esquizofrenia ou resposta farmacológica. Optou-se pela escolha de eQTLs, mesmo que definidos para outros tecidos, e já estudados em vias associadas a oncogênese/apoptose e controle metabólico:

a) rs2295080; rs1034528; rs1883985.

Para o gene SLC1A2 decidiu-se investigar o seguinte SNP:

a) rs4354668 – associação com cognição em Esquizofrenia (Spangaro et al., 2012); associação com volume de hipocampo e experiência adversas na infância (Poletti et al., 2014); associação entre curso de doença e uso de lítio em TB (Dallaspezia et al., 2012); associação com resposta ao lítio *in silica* (Higgins et al., 2015).

Para os genes BDNF e BCL2 investigou-se o perfil de metilação de regiões promotoras e sua interação com os SNPs na mediação de resposta ao lítio. Essas proteínas são importantes efetoras na regulação de ciclo celular, apoptose e manutenção de sinapses, fatores estes essenciais na contenção dos prejuízos celulares causados pela disfunção de vias sinalizadoras potencialmente associadas ao desenvolvimento e progressão da doença:

b) CpG1 (cg05218375) – CpG2 (cg23497217) – CpG3 – sítios localizados na região promotora IV do gene codificante de BDNF e associados previamente a eficácia antidepressiva e TB (Braithwaite et al., 2015); CpG1 e CpG2 se localizam em sítio de ligação de CREB, fator de transcrição diretamente ligado a vias de sinalização reguladas por lítio.

c) CpG1 (cg03813215) – CpG2 – CpG3 – sítios localizados em região promotora P2 de BLC2, a 88bp do sítio transcrição inicial do gene, potencialmente associado a regulação da transcrição.

Tendo em vista a associação de tamanho de telômero com resposta a lítio e doenças crônicas optou-se por investigar sua relação como possível mediador da resposta terapêutica através da interação com as demais variantes.

4.4 Métodos de laboratório

4.4.1 Extração de DNA de sangue total

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total utilizando o método "*Salting Out*", descrito por Miller et al. (1988). As amostras de DNA foram purificadas com a utilização do *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNA purificadas foram avaliadas quanto à concentração e pureza por meio da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (*NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific*). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese, em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio.

4.4.2 Genotipagem

A análise de genotipagem para avaliar as 11 variantes polimórficas foi realizada nos 213 pacientes selecionados. Em alguns casos não foi possível determinar o alelo em virtude da qualidade da amostra ou de problemas técnicos na preparação das mesmas. Isto ocorreu em menos de 5% dos casos para cada gene.

A genotipagem foi realizada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, utilizando o sistema *7500 Fast Real-Time PCR* (*Thermo Fisher Scientific*). Cada reação foi constituída por 50ng de DNA genômico, 1,25µL de *TaqMan SNP Genotyping Assay* (*Thermo Fisher Scientific)* e 12,5µL de *TaqMan Genotyping Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific)* para um volume final de 25 µL. As condições de ciclagem utilizadas foram: 60ºC por 1 minuto, 95ºC por 10 minutos e 40 ciclos consecutivos de 95ºC por 15 segundos e 60ºC por 1 minuto.

Todas as amostras de DNA purificadas apresentaram concentração e pureza adequadas e dentro dos pararâmetros estabelecidos. O DNA íntegro pode ser visto como uma grande e única banda na região superior do gel de agarose (Figura 2).

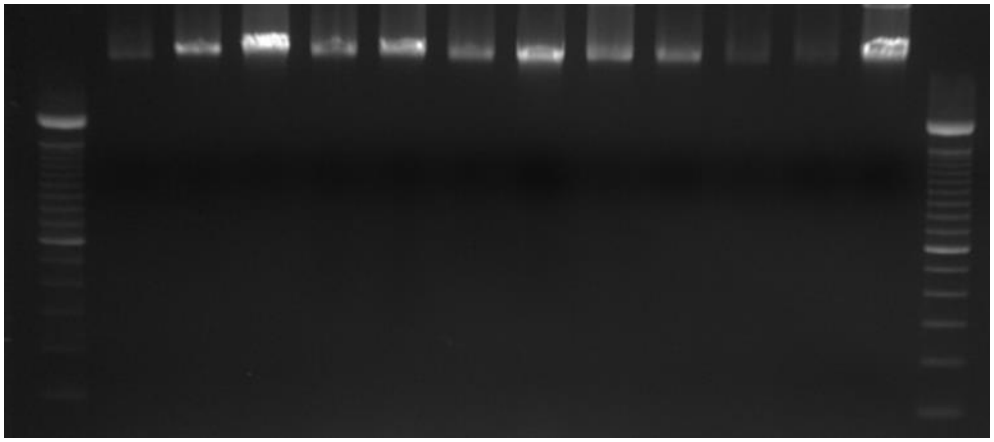

Figura 2. Géis de agarose a 1,5% de parte das amostras utilizadas no presente projeto demonstrando uniformidade quanto a qualidade e integridade do DNA. Na primeira e última colunas está representado o marcador de peso molecular que varia de 1000-100pb.

Os resultados de genotipagem foram avaliados com a utilização do *real-time PCR instrument software* (*Thermo Fisher Scientific)*. A discriminação alélica de cada variante foi verificada como um *plot* de alelo 1 (marcado com o fluoróforo VIC) versus alelo 2 (marcado com o fluoróforo FAM). Cada amostra foi representada como um ponto individual no *plot* que demonstra grupos homozigotos, um grupo heterozigoto e o controle negativo empregado no experimento (Figura 3).

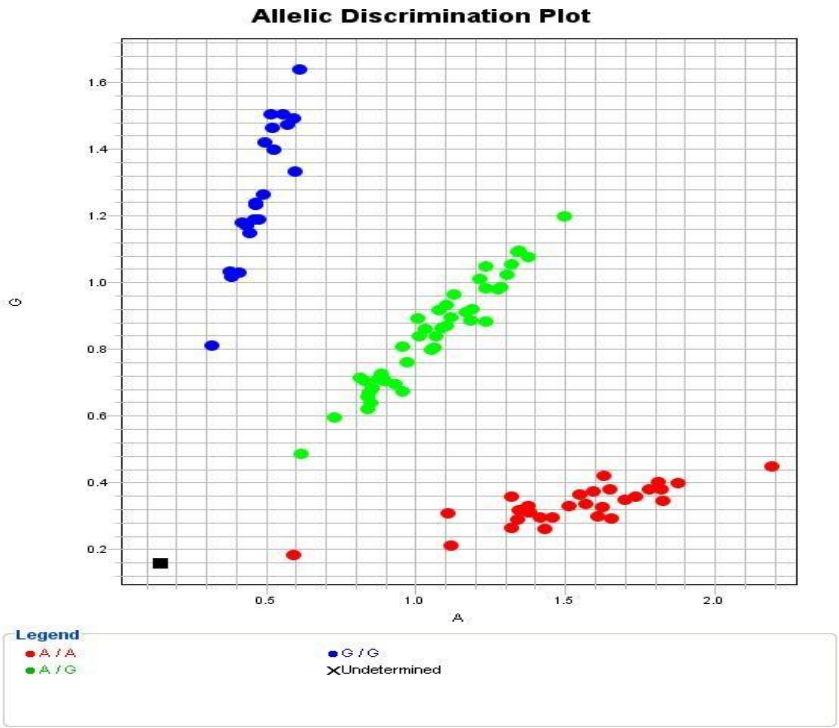

Figura 3. Figura representativa de discriminação alélica para o rs334558 do gene GSK3B. As cores, vermelha, azul e verde representam alelo1/alelo1, alelo2/alelo2 e alelo1/alelo2, respectivamente.

4.4.3 Avaliação do comprimento dos telômeros

A avaliação de comprimento relativo telomérico foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real, de acordo com o protocolo adaptado de Cawthon (2002). As amostras de DNA purificadas de 213 pacientes, após quantificação por espectrofotometria, foram diluídas para 2 ng/ul em placas de 96 poços. Para cada reação foram utilizas 6 ng de gDNA e cada amostra foi corrida em triplicata. O procedimento foi realizado utilizando dois pares de *primers*, um para telômeros (Tel1/Tel2) e um para o gene de cópia única *36B4* (*acidic ribosomal phosphoprotein P0*) (36B4u/36B4d) (Tabela 2), com concentração final de 300nM/900nM e 300nM/500nM, por reação respectivamente.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos para ensaios de avaliação de comprimento telomérico.

Oligonucleotídeos	Sequências
Tel1	5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'
Tel2	5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'
36B4u	5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
36B4d	5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Todos os experimentos de PCR em tempo real foram realizados no equipamento *Quant Studio 12K Flex Real Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com as recomendações descritas no protocolo do *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany)*. Junto com as amostras, em cada placa de 384 poços foi corrido uma curva padrão com 7 pontos de fator de diluição 2, sendo elaborada a partir de uma amostra controle

de DNA genômico humano comercial (*Human Genomic DNA*, *Promega Corporation*) e com primeiro ponto fixado em 12ng. Além da curva padrão, em cada placa também utilizamos dois *pools* de amostras de DNA genômico de três indivíduos do sexo feminino (QC1) e masculino (QC2) de diferentes idades. Tanto a curva quanto os *pools* foram empregados em quadriplicata com o objetivo de normalizar possíveis variações experimentais. Como amostra referência utilizamos o ponto de 6ng da curva padrão, ponto, este, referente a quantidade de amostra utilizado nas reações. Uma eficiência de amplificação entre 90 e 110% foi observada em cada reação, assim como curvas de dissociação com pico único.

A análise de medida de comprimento telomérico relativo foi adaptada a partir do método descrito por Cawthon (2002; 2009) e determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O valor resultante é proporcional ao tamanho médio de telômeros.

4.4.4 Análise da metilação do DNA

A metilação do gene específica foi avaliada com a técnica de pirosequenciamento. Para essa análise, foram avaliados sítios CpG em dois genes, *BCL2 (BCL2 apoptosis regulator)* e *BDNF (Brain-derived neurotrophic factor).*

Para a análise de pirossequenciamento, foram desenhados *primers* específicos para observar os sítios CpG alvos dos genes BCL2 e BDNF. Os *primers* de pirossequenciamento foram desenhados com o *software PyroMark Assay Design SW 2.0* (Qiagen) (Tabela 4).

Foi obtido resultados para 46 pacientes em relação ao BCL2 e 20 pacientes em relação ao BDNF.

Tabela 3. Desenho dos *primers* para pirossequenciamento.

Gene	Sítios CpG	Posição	Especificação	Desenho do Primer (5' - 3')
BCL2	cg03813215	chr18:60,986,679	Forward	TTGTAGAGAAGGGGAAAATATTATAGGAT
	pos2	chr18:60,986,676	Reverse [Biotinilado]	TTCCAAATCCATTCCCAAACTTCTACTTC
	pos3	chr18:60,986,673	Sequencing	GAATATAGGATTGAAAATTGTAAT
BDNF	cg05218375	chr11:27,723,218	Forward	GAGGTAGAGGAGGTATTATAT
	cg23497217	chr11:27,723,214	Reverse [Biotinilado]	AACCAAAAACTCCATTTAATCTC
	pos3	chr11:27,723,203	Sequencing	AGGTAGAGGAGGTATTATATGA

Dados obtidos pelo projeto ENCODE e indetificados pela plataforma *Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array.*

As amostras de DNA purificadas passaram por tratamento com bissulfito de sódio com o kit *EZ DNA methylation Kit* (Zymo Research., Irvine, California, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA bissulfito convertido foi amplificado pelo procedimento de PCR utilizando o kit *PyroMark PCR Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante, com as seguintes condições: 95°C por 15 minutos, 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e extensão final de 72°C por 10 minutos. Para cada ensaio, foi adicionado um *pool* de todas as amostras para avaliar o

viés entre as placas e utilizou-se DNA de controle bissulfito convertido metilado e bissulfito convertido não metilado (*EpiTect PCR control DNA*, Qiagen) em uma curva padrão de 5 pontos (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Para adequar o sinal em relação ao ruído de fundo ("*background*") e para verificar a eficiência da conversão do DNA com bissulfito de sódio, o *software* incluiu pelo menos uma dispensação 'controle' nas reações. As análises de pirosequenciamento foram realizadas com o sistema *PyroMark Q24 system* (Qiagen). As porcentagens de metilação dos sítios CpG fornecidas pela análise de pirosequenciamento foram calculadas como a proporção de C (citosina) para C + T (citosina + timina), como implementado no *software PyroMark Q24 2.0.7* (Qiagen). As amostras foram normalizadas pela curva padrão de 5 pontos, usando uma regressão polinomial cúbica ou uma regressão hiperbólica, de acordo com o modelo de melhor ajuste (Moskalev et al., 2011).

4.5 Análise estatística

Na análise descritiva das variáveis qualitativas foram utilizadas as frequências absolutas e relativas, e para a análise das variáveis quantitativas foram utilizadas medidas de tendência central, posição e dispersão.

Para comparar o ALDA score e a metilação entre as variáveis clínicas e o polimorfismo foram utilizados os testes de Mann-Whitney (Hollander; Wolfe, 1999) e o teste de Kruskal-Wallis (Hollander; Wolfe, 1999). A fim de comparar o do Telômero entre as variáveis clínicas e o polimorfismo, controlando pela idade no início da doença e pelo sexo, utilizou-se a Regressão Linear. Cabe ressaltar

que para as variáveis que apresentaram mais de um nível, como por exemplo, o tipo de episódio inicial todos os níveis foram comparados par a par e foi apresentado o valor-p mínimo da mesma. Todos os testes foram bicaudais (*two-tailed*) e a significância estatística assumida em $p < 0,05$.

Para verificar a correlação entre as variáveis quantitativas, utilizou-se a correlação de Spearman (Hollander; Wolfe, 1999). A correlação de Spearman é uma medida limitada entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo o coeficiente estiver de -1 maior a correlação negativa e quanto mais próximo o coeficiente estiver de 1 maior a correlação positiva.

A fim de verificar a interação entre os SNPs e a metilação foram identificados grupos de indivíduos com características semelhantes através da Análise Hierárquica de Agrupamento (Hair *et al*., 2009), utilizando o Método de Ward com coeficiente de similaridade de Gower (Gower, 1971), que é adequado para o cálculo da similaridade quando se tem dados mistos (qualitativos e quantitativos).

O *software* utilizado nas análises foi o R (versão 3.5.1).

Foi utilizado o software livre *Multifactor Dimentionality Reduction* (MDR) versão 3.0.2 para testar as interações entre diferentes SNPs.As configurações de teste foram determinadas para validação cruzada em 10 vezes e a razão limite foi estabelecida em 0.25 em virtude da proporção entre casos (respondedores) e controles (não respondedores).

5 RESULTADOS

5.1 Topologia da rede de genes

Usando o programa STRING para avaliar o enriquecimento funcional da rede proposta encontrou-se maior significância para processos biológicos relacionados a “regulação de morte neuronal” com 5 genes associados (GO:1901214; FDR 6.66e-06). A análise de termos KEGG mostrou resultados significativos para “vias de sinalização de neurotrofinas” com 4 genes (hsa04722; FDR = 4.56e-07) e vias ligadas a câncer de próstata e colorretal com 4 genes cada uma (hsa05215; FDR = 4.56e-07 e hsa05210; FDR = 4.56e-07). As mesmas correlações são mantidas caso se exclua MTOR da rede, pensando que poderia contribuir para a maior associação com vias de câncer. Entre os componentes celulares envolvidos, as mitocôndrias se sobressaem com 5 genes (GO:0005739; FDR = 0.0019).

O programa NetworkAnalyst mostra a expansão da rede e fornece o grau de centralidade de intermediação que revela AKT1, GSK3B, MTOR, BCL2 como grandes *hubs*, enquanto SCL1A2 e BDNF ficam mais periféricos. Interessante observar que a rede fornece pistas da importância de algumas proteínas que fazem a conexão entre esses hubs, e que podem ser investigadas de modo mais sistemático em estudos baseados em hipóteses. Algumas delas, com alto grau de centralidade de intermediação, são APP, MAPK, BAX, HSP90AA1, UBC, TP53, IRS1, BCL2L11, STAT3, FKBP8, BRCA1, PSEN1. (Figura 4)

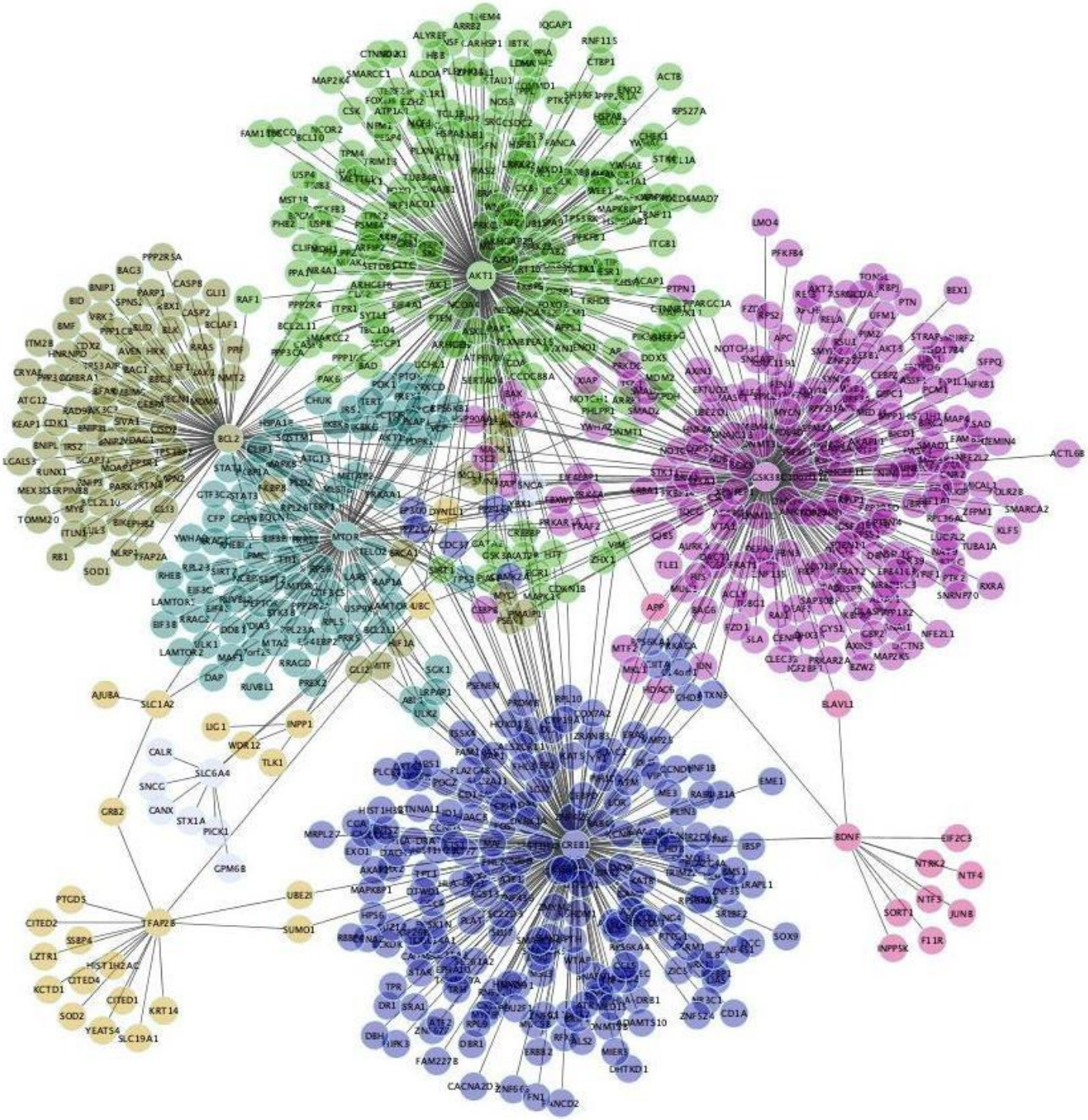

Figura 4. Rede e subredes de genes estudados e suas relações topológicas.

5.2 Caracterização da amostra

A amostra apresenta uma idade média 46,11 anos (dp = 14,15). A idade média do primeiro episódio foi de 27,17 anos (dp = 12,14). O tempo médio de doença foi de 18,67 anos (dp = 11,25); o tempo médio de uso de lítio na coleta foi de 7,69 anos, enquanto sua mediana foi igual a 5 anos. Em média, os indivíduos apresentaram 9,45 anos de estudos (dp = 4,26 anos). Sexo feminino foi predominante, representando 68,08% da amostra. A caracterização étnica baseou-se nas descrições subjetivas dos indivíduos e entrevistadores, de modo que está sujeita a importante viés. Os pacientes de origem étnica caucasiana representaram ¾ da amostra.

Entre os grupos de resposta dicotômica não houve diferença entre sexo (p = 0,524), médias de idade na coleta (p = 0,726), cor (p = 0,903), idade de início da doença (p = 0,600), tempo de doença (0,956), anos de uso de lítio (0,824), polaridade predominante (0,463), comportamento suicida (0,734), presença de alucinações (p = 0,528), presença de delírios (p = 0,833), n´mero de episódios maníacos (p = 0,655) ou depressivos (p = 0,222).

Houve correlação significativa e positiva do tempo da doença com o tempo de uso de lítio (ρ = 0,48), fato perfeitamente compreensível.

Considerando-se resposta como variável contínua observou-se que:

a) O escore da escala se correlaciona positivamente (ρ = 0,28) com o tempo de uso de lítio.
b) Os indivíduos do sexo masculino apresentaram escore na escala de Alda significativamente maior (p = 0,034) que os indivíduos do sexo feminino.

c) Aqueles indivíduos que não apresentaram tentativa de suicídio tiveram o escore significativamente maior (p = 0,033) em relação aos indivíduos que tentaram suicídio.

Ao categorizar o escore de Alda em 3 grupos de resposta, NR (não respondedores), RP (respondedores parciais) e R (bons/excelentes respondedores) pode se observar:

a) Fobia social foi diagnóstico psiquiátrico em comorbidade com TB mais associado a resposta parcial (X^2 = 8,037; p = 0,013).

Considerando-se apenas os critérios A da escala em um modelo de resposta categórico observou-se:

a) Sexo masculino associa-se a melhor resposta (p = 0,037).
b) Episódio inicial maníaco associa-se a melhor resposta (p = 0,003).
c) Ciclagem para mania com uso de antidepressivo se associa a pior resposta (p = 0,008).

Como alternativa de agrupamento, uniu-se o grupo de RP ao grupo de NR e comparou-se ao grupo R:

a) Presença de quadro demencial tende a se associar a pior resposta ao tratamento (X^2 = 9,266; p = 0,07) quando se uniu grupo de não respondedores e respondedores parciais.

As caraterísticas sociodemográficas e clínicas e sua relação com escore de Alda estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Análise descritiva das variáveis clínicas qualitativas e associação com resposta na escala ALDA (NR = não respondedor; RP = respondedor parcial; R = respondedor) considerando escore total.

Variáveis		**N**	**%**	**NR**	**RP**	**R**	**Estatística**	***p***
Sexo	Feminino	145	68,08%	88	45	12	2,165	0,372
	Masculino	68	31,92%	34	27	7		
	Total	213						
Cor	Amarela	4	1,88%	2	1	1	2,584	0,847
	Branca	158	74,18%	89	55	14		
	Negra	5	2,35%	4	1	0		
	Parda	46	21,60%	27	15	4		
	Total	213						
Tipo de episódio inicial	Depressão	110	55,00%	59	39	12	1,409	0,512
	Psicótica	20		13	5	2		
	Puerperal	6		3	3	0		
	Mania	90	45,00%	54	30	6		
	Hipomania	2		1	1	0		
	Psicótica	56		34	17	5		
	Total	200						
Presença de episódio predominante	Não	75	37,13%	43	23	9	1,707	0,445
	Sim	127	62,87%	72	46	9		
	Mania	71						
	Depressão	56						
	Total	202						

Tipo de mania predominante	Disfórica	101	49,27%	58	34	9	0,144	0,934
	Eufórica	104	50,73%	57	37	10		
	Total	205						
História de doença psiquiátrico em familiar	Não	23	13,70%	14	9	0	2,074	0,360
	Sim	145	86,70%	86	46	13		
	Total	124						
História de TB em familiar	Não	54	43,55%	33	18	3	0,49	0,843
	Sim	70	56,45%	43	21	6		
	Total	124						
História de uso de lítio em familiar	Não	67	82,70%	40	23	4	3,226	0,197
	Sim	14	17,30%	7	4	3		
	Total	132						
Presença de ideação suicida	Não	82	42,70%	39	34	9	3,854	0,158
	Sim	112	57,30%	69	33	10		
	Tentativa	64		42	16	6	4,232	0,118
	Total	192						
Presença de alucinações	Não	80	41,50%	35	37	8	8,943	**0,011**
	Sim	113	58,50%	73	30	10		
	Total	193						

Presença de delírios	Não		22	10,90%	9	12	1	5,551	0,206
	Sim		179	88,60%	104	57	18		
	Total		201						
Início de crise no período puerperal	Não		76	72,40%	42	26	8	1,060	0,554
	Sim		29	27,60%	19	7	3		
	Total		105						
Padrão de Evolução	Não		145	84,79%	82	52	11	2,791	0,267
	Sim		26	15,21%	16	6	4		
		MDI	16		9	4	3	2,463	0,258
		DMI	10		7	2	1	1,062	0,602
	Total		171						
Ciclagem para mania com antidepressivo	Não		81	51,30%	45	28	8	0,23	0,915
	Sim		77	48,70%	43	28	6		
	Total		158						
Comorbidade com uso droga	Não		108	55,10%	54	42	12	3,663	0,154
	Sim		88	44,90%	56	25	7		
		tabaco	66						
		cannabis	15						
		alcool	25						
		cocaina	13						
		outras	8						
	Total		196						

Comorbidade com doença psiquiátrica	Não	153	76,50%	83	54	16	0,937	0,639
	Sim	47	23,50%	29	15	3		
	T. de Ansiedade Generalizada	13						
	T. Obsessivo-Compulsivo	19						
	T. do Pânico	12						
	THDA	8						
	Fobia Social	5						
	T. Personalidade	3						
	Outros	4						
	outras	8						
	Total	200						
Comorbidade com doença clínica	Não	48	24,49%	20	21	7	5,636	**0,060**
	Sim	148	75,51%	90	46	12		
	Hipotireoidismo	87						
	Dislipidemia	46						
	DM2	33						
	HAS	31						
	Obesidade	31						
	Demência	21						
	Enxaqueca	8						
	Doença de Parkinson	6						

		Diabetes Insipidus	7
		IRC	6
		Câncer	5
		Outros	31
	Total		196

5.3 SNPs e Metilação

A distribuição de frequência de alelos e genótipos está apresentada na tabela 5.

Houve diferença significativa (p = 0,044) da metilação do BCL2 na posição 3 e comorbidade com álcool, sendo que os indivíduos que não apresentaram comorbidade alcoólica tiveram a metilação maior que os indivíduos que apresentaram comorbidade alcoólica.

Analisou-se a existência de correlação entre variantes polimórficas e metilação. Teste de comparação múltipla mostrou que os indivíduos que apresentaram genótipo GG para SLC1A2 rs4354668 tiveram uma metilação do sítio 3 do gene BCL2 marginalmente maior que os demais.

O sítio de metilação de posição 3 no BDNF associou-se significativamente com o AKT1 rs2498786 (p = 0,019), sendo que pelo teste de comparação múltipla, os indivíduos com alelo CC apresentaram a metilação menor que os indivíduos com alelo CG. O mesmo ocorreu para MTOR rs1034528 (p = 0,019) e metilação em sítio cg23497217, sendo que pelo teste de comparação múltipla, os indivíduos com alelo GG apresentaram a metilação maior que os indivíduos com alelo CG.

Para o SNP SLC1A2 rs4354668, os indivíduos que apresentaram o alelo G tiveram a metilação do BDNF IV cg05218375 significativamente maior que os indivíduos sem o alelo G (p = 0,042). Para a variante AKT1 rs1130214,

portadores do alelo A tiveram a metilação do BDNF IV cg05218375 significativamente menor que os indivíduos sem o alelo A (p = 0,042).

O sítio BDNF IV cg23497217 estava significativamente menos metilado em indivíduos com alelo C de MTOR rs1034528 (p = 0,005). Em indivíduos com alelo C de MTOR rs1034528 a posição 3 do BDNF também estava menos metilada (p = 0,021), igualmente ocorrendo naqueles com alelo T de SLC1A2 rs4354668 (p = 0,047).

Houve correlação positiva e significativa da metilação do BCL2 cg03813215 com a metilação do BCL2 na posição 2 (ρ = 0,66) e 3 (ρ = 0,71), ou seja, quanto maior for a metilação do BCL2 cg03813215 maior tende a ser a metilação do BCL2 na posição 2 e 3. Do mesmo modo, houve correlação positiva e significativa da metilação do BDNF IV na posição 3 com a metilação do BDNF IV cg05218375 (ρ = 0,52) e do BDNF IV cg23497217 (ρ = 0,70), logo quanto maior for a metilação do BDNF IV cg23497217 na posição 3, maior tende a ser a metilação dos demais sítios. Essa correlação poderia ser explicada pela proximidade dos sítios.

Em relação à interação entre os sítios de metilação dos dois genes, houve correlação negativa e significativa da metilação do BCL2 na posição 3 com a metilação do BDNF IV cg23497217 (ρ = - 0,59) e BDNF IV na posição 3 (ρ = - 0, 73), logo quanto maior foi a metilação do BCL2 na posição 3, menor tende a ser a metilação do BDNF IV cg23497217 e BDNF IV na posição 3.

Tabela 5. Características e distribuição de frequência dos alelos e genótipos para cada SNP investigado.

Gene[a]			Posição[c]	Alelo [b]			Função	Genótipos			HWE	
Nome	**Banda**	**SNP ID**		**Ancestral**	**Variante**	**MAF[d]**					**X^2**	***p***
AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)	14q32.33	rs2494732	chr14:105,239,192	*T* 48,56%	*C* 51,44%	*T* 47,5%	Variante intron 11/14*	*CC* 24,04% (N=50)	CT 49,04% (N=102)	TT 26,92% (N=56)	0,0412	0,8391
		rs3730358	chr14:105,246,407	*G* 22,14%	*A* 77,86%	*A* 17,4%	*Intron 4/14*	*AA* 4,76% (N=10)	AG 34,76% (N=73)	GG 60,48% (N=127)	0,0705	0,7906
		rs1130214	chr14:105,259,734	*C* 32,13%	*A* 67,87%	*A* 24%	Intron 1/14	*AA* 10,63% (N=22)	AC 43,00% (N=89)	CC 46,38% (N=96)	0,0141	0,9055
		rs2498786	chr14:105,262,368	*C* 50,00%	*G* 50,00%	G: 37.2%	Promotor – sítio TF	CC 26,44% (N=55)	CG 47,12% (N=98)	GG 26,44% (N=55)	0,6923	0,4088
GSK3B (Glycogen synthase kinase-3 beta)	3q13.33	rs1732170	chr3:119,583,676	T 48,19%	C 51,81%	C: 40,7%	Intron 9/11*	CC 21,53% (N=45)	CT 54,07% (N=113)	TT 24,40% (N= 51)	1,4133	0,2345
		rs334558	chr3:119,813,282	A 54,37%	G 45,63%	A: 40,1%	Promotor – eQTL(?) – sítio TF	AA 27,67% (N=570	AG 53,40% (N=110)	GG 18,93% (N=39)	1,1954	0,2742
		rs3755556	chr3:119,814,957	C 1,44%	A 98,56%	A: 0,3%	Promotor – sítio TF	AA 0,00% (N=0)	AC 2,87% (N=6)	CC 97,13% (N=203)	0,0443	0,8333

MTOR mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	1p36.22	rs1034528	chr1:11,322,156	G 26,67%	C 73,33%	C: 28,9%	Intron 28/58**	CC 5,24% (N=11)	CG 42,86% (N=90)	CG 51,90% (N= 109)	0,8161	0,3662
		rs1883965	chr1:11,249,132	A 29,25%	G 70,75%	A: 30,6%	Intron 1/58*	AA 8,49% (N=180	AG 41,51% (N=88)	GG 50,00% (N=106)	1,9264	0,1651
		rs2295080	chr1:11,322,628	G 35,78%	T 64,22%	G: 46,2%	Promotor* - sítio TF	GG 11,37% (N=24)	GT 48,82% (N=103)	TT 39,81% (N=84)	0,8161	0,3662
SLC1A2 solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	11p13	rs4354668	chr11:35,440,976	T 57,62%	G 42,38%	T: 38%	Intron1/11 – eQTL - sítio TF	TT 20,48% (N=43)	GT 43,81% (N=92)	GG 35,71% (N=75)	2,2271	0.1351

chr: cromossomo; MAF: frequência de alelo menor; HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; TF: fator de transcrição.

a. Símbolo e nome do gene conforme NCBI; b. Código da variante conforme dbSNP/NIH-NCBI; c. UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly;

d. Minor allele frequency (MAF) de acordo com 1000Genome - população global.

** eQTLem outros tecidos;*

*** região promotora do gene ANGPTL7; eQTL para gene EXOSC10 em cerebelo.*

5.4 Resposta terapêutica, SNPs e metilação

Considerando-se resposta como variável contínua e utilizando o escore total da escala observou-se que:

a) Houve diferença significativa entre o SNP AKT1 rs3730358 e o escore da escola para o genótipo AA (p = 0,038). Porém, o teste de comparação múltipla não evidenciou nenhuma diferença significativa entre os alelos.
b) Em relação ao SNP AKT1 - rs1130214, houve diferença marginalmente significativa (p = 0,056) da presença do alelo A, sendo que os indivíduos que apresentaram o alelo A presente apresentaram escore maior que os indivíduos sem o alelo A.
c) Houve correlação significativa e positiva do escore de Alda com a metilação do BDNF IV cg05218375 (ρ = 0,53).

Não houve associações entre variantes de SNPs e perfil de metilação e a resposta contínua ou categórica ao se considerar escore A.

5.5 Telômeros

As análises realizadas pelo T-Test independente com correção de Kruskal-Wallis e não apresentaram significância estatística quanto sexo e TL. Ao analisar contudo a correlação sexo e TL pelo método *pairwise* observa-se uma

diferença significativa a favor dos homens (p = 0,0237; corrigido por Bonferroni).

Os indivíduos que tentaram suicídio ao longo da vida apresentaram o telômero significativamente maior (p = 0,044) que os indivíduos sem histórico de comportamento de auto-eliminação.

Controlando pela idade na coleta e pelo sexo, houve correlação positiva e significativa do TL com o tempo de doença (ρ = 0,18). Todavia, não houve correlação entre resposta terapêutica, tanto como variável contínua quanto como variável categórica, e tempo de uso de lítio e TL.

Ao se controlar pela idade na coleta e por sexo, encontrou-se diferença significativa entre MTOR rs1883965 e TL, sendo que os indivíduos que apresentaram o alelo AG tiveram o telômero significativamente maior (p = 0,010)

em relação aos indivíduos com alelo AA. Em relação aos alelos, os portadores da variante C do MTOR rs1034528 se associou com maior TL (p = 0,041).

5.6 Análise da interação entre genes e sítios de metilação na determinação da resposta terapêutica ao lítio

Para avaliar interação utilizou-se uma análise de agrupamento. Optou-se por trabalhar com 2 grupos baseando-se no grau de similaridade entre os indivíduos em relação à genotipagem e em relação aos alelos que carregavam. Diferentes modelos de interação foram testados sem contudo resultar em significância na capacidade de separar respondedores de não respondedores

nas abordagens contínua ou dicotômica de resposta.

Como alternativa, as interações mútuas entre os SNPs foram analizadas utilizando-se o software *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR) (Motsinger; Ritchie, 2006). Não foram encontrados associações preditivas de resposta em modelos interativos de 2 e 3 *loci* . Os melhores resultados estão apresentados na tabela 7. Restrições em relação aos parâmetros computacionais não permitiram testes com mais *loci*. Os sítios de metilação combinados com os SNPs também não obtiveram relevância estatística em nenhum modelo de interação.

Tabela 6. Associações entre alelos e genótipos de AKT1, MTOR e SLC1A2 e os sítios de metilação de BDNF e BCL2.

Variantes	**BDNF promotor IV**			**BCL2**		
	cg05218375	**cg23497217**	**posição 3**	**cg03813215**	**posição 2**	**posição 3**
AKT1 rs2498786 alelo G	-	↓	↓	-	-	-
AKT1 rs1130214 alelo A	↓	-	-	-	-	-
MTOR rs1034528 alelo C		↓	↓	-	-	-
MTOR rs1034528 genótipo GG	-	↑	-	-	-	-
SLC1A2 rs4354668 alelo T	-	-	↓	-	-	-
SLC1A2 rs4354668 alelo G	↑	-	-	-	-	-
SLC1A2 rs4354668 genótipo GG	-	-	-	-	-	↑

Tabela 7. Resultados de análises de interações multivariadas entre SNPs.

Modelo	Training balance accuracy	Testing balance accuracy	P*	Consistência de validação cruzada
rs4354668	0,6788	0,6373	0,5442	9/10
rs43546683 +rs1034528	0,7544	0,6536	0,5005	8/10
rs2494732+rs179232170+rs334558	0,8622	0,6784	0,4159	10/10

*Valor de p baseado em 1000 permutações.

6 DISCUSSÃO

A maioria das variações fenotípicas relacionadas à resposta terapêutica resulta de complexa interação entre múltiplos passos metabólicos, que, cada qual de um modo discreto, podem influenciar o efeito final das drogas. Ao contrário do que se observa para um defeito monogênico, em que a distribuição populacional é polimodal, dependente da existência ou não do genótipo específico, a interação entre vários produtos gênicos potencialmente polimórficos determina uma distribuição *gaussiana*, refletindo a variabilidade contínua na população.

Embora não se tenha um perfil de genes estabelecido ligados a qualquer doença complexa, não há questionamento de sua natureza poligênica. Ainda mais, é fato sua relação multissistêmica bem como sua interação com o ambiente, hábitos de vida e qualidade das vivências principalmente na primeira infância. Conforme se desvendam os mecanismos que governam a dinâmica do genoma humano, mais parâmetros necessitam ser inseridos na compreensão da arquitetura genética dessas doenças. Por um lado, modelos mais precisos conseguem explicar com maior poder preditivo a associação de fenótipo e seu equivalente genético. Por outro, maiores limitações estão implicadas uma vez que para incorporar pequenos efeitos, as amostras necessitam crescer exponencialmente.

Há uma grande sobreposição e compartilhamento de genes entre essas doenças, não apenas restringindo-se às ligadas a um mesmo órgão. Encontram-se genes associados a DM2, a HAS e doenças cardiovasculares, a doenças autoimunes e neoplasias em doenças neuropsiquiátricas. Entre as doenças

psiquiátricas o compartilhamento de genes associados ao risco é a regra. Esse fenômeno pleiotrópico permite uma grande economia celular de origem evolutiva. As vias de sinalização intracelulares fundamentais, como Wnt/GSK3B/β-catenina, aparecem em organismos muito simples e foram adquirindo interconexões entre si com surgimento de novos componentes, permitindo uma multiplicidade de funções com especializações bastante distintas entre diferentes tecidos e conforme o ciclo de vida. Múltiplas vias interconectadas em diversos pontos criam uma rede com muitas possibilidades de autorregulação, compensações e respostas distintas a diferentes estímulos.

A teoria dos grafos traz luz a compreensão desse mecanismo, matematicamente descrito como um sistema complexo dinâmico. O próprio cérebro funciona como uma subrede com múltiplos nódulos interconectados com funções diferentes que se modulam na resposta aos estímulos. Além dessa característica pleiotrópica, e contribuindo para sua manifetação, é necessário considerar as modificações na expressão dos genes em cada fase de desenvolvimento de vida, e as diferenças na expressão entre os diferentes tipos celulares. O controle da expressão dos genes portanto define o tipo de célula e as funções possíveis para ela executar, uma vez que controla a importância das vias intracelulares associadas a eles. Os mecanismos epigenéticos surgem como modo de controlar quais genes serão transcritos, quando e em que quantidade.

Mesmo que a resposta farmacológica se associe a genes mais periféricos na rede, elementos centrais têm importante papel na geração de doença e em farmacogenética, como GSK3B e AKT1 em psiquiatria e MTOR em oncologia e

metabologia. Detectar proteínas e genes que se relacionam aos mecanismos epistáticos de interesse permitem a construção e expansão de redes protéicas podem fornecer novos candidatos para investigação e orientar hipóteses para a continuidade dos estudos de associação. Inúmeros potenciais candidatos surgem destas redes, como já observado na construção da rede PPI dos genes utilizados neste estudo. Ressaltou-se por exemplo APP, MAPK, BAX, HSP90AA1, UBC, TP53, IRS1, BCL2L11, STAT3, FKBP8, BRCA1, PSEN1, de alguma forma já associados a doenças neuropsiquiátricas mas ainda não extensivamente investigados como mediadores e efetores farmacológicos. Pode-se utilizá-los em futuros modelos de interação epistática, juntamente com elementos finais das vias como hTERT, HDACs, DMNTs, receptores de membrana glutamatérgicos. Acrescentar a esta rede o perfil de metilação destes e de outros genes altamente regulados em sua expressão por lítio, traria ganhos importantes, mesmo que pequenos. Exemplo contundente é trazido por Shi et al. (2017) ao combinar marcadores genéticos e epigenéticos na detecção de eficácia à risperidona em pacientes esquizofrênicos encontraram combinação de 3 SNPs e 1 sítio de metilação associados à resposta terapêutica na população estudada, o que não ocorreu com SNPs isolados ou combinados em números diferentes entre si ou com outros sítios de metilação. Muito embora os ganhos sejam ainda marginais ao se incorporar elementos regulatórios como os fatores epigenéticos, não há dúvidas de que isto seja necessário para se produzir testes farmacogenéticos com sensibilidade e especificidade aceitáveis.

Importante crítica a estudos em genética de doenças que afetam o cérebro diz respeito ao tipo celular estudado. Ao utilizar sangue como tecido de estudo, extrapolações dos achados se tornam altamente questionáveis. Do ponto de vista estrutural não se esperaria importantes modificações, mas em relação aos mecanismos regulatórios de transcrição e vias moleculares preferenciais, e consequente resposta a estímulos, as diferenças podem ser relevantes. Há estudos comparando metilação em sangue e cérebro que mostram compatibilidade para alguns genes em relação aos diferentes tecidos (Andrews et al., 2017; Rey et al., 2018) e ferramentas em bioinformática desenvolvidas para interpretar os achados em sangue considerando o contexto cerebral (Edgar et al., 2017). Portanto, estudar metilação em sangue e inferir seu papel em cérebro não parece ser inadequado. Mas uma forma de contornar esse problema tem sido a utilização de cultura de fibroblastos derivados de pacientes, iPSCs e organóides, este último ainda impraticável em nosso meio.

A partir dessa compreensão, múltiplos fatores que devem ser considerados ao estudar genética nas doenças psiquiátricas, tanto em relação à apresentação clínica, quanto em relação à resposta ao tratamento. Diversos moduladores externos influenciam isso, mas dependem em última análise da repercussão ou capacidade de perturbação da homeostase de diferentes células neuronais e da glia conforme sua localização e especialização em diferentes módulos funcionais no SNC.

A exploração desses mecanismos pode ocorrer através de estudos sem hipótese *a priori*, como feito pelos grandes estudos de associação com genoma inteiro, tanto na procura de variantes polimórficas pequenas (SNPs, CNVs), de

sítios diferenciados de metilação (EWAS), de genes transcritos (exoma/transcriptoma/reguloma), de expressão gênica em culturas de neurônios e de proteoma/metaboloma. Por outro lado, estratégias orientadas por hipóteses, como o presente estudo, conseguem ser bastante informativas e permitem checar a validade dos achados nos estudos anteriores. Neste sentido, a escolha dos genes, regiões ou sítios para os estudos de associação é de extrema importância. As variantes polimórficas avaliadas estão em genes centrais na regulação de diferentes vias relacionadas aos mecanismos definidos e propostos para a ação do lítio em neurônios. A maioria dos estudos explorando as vias e sítios de ação de lítio provêm de neurônios de hipocampo, importante componente do sistema límbico. AKT1, GSK3B e MTOR representam hubs interconectando vias sinalizadoras de receptores de monoaminas, hormônios, citocinas e fatores de crescimento. Seus substratos fazem parte de diferentes vias reguladoras de resposta ao estresse celular, de controle da dinâmica e viabilidade sináptica e de regulação de apoptose, mecanismos todos sob influência do lítio. Outro gene de interesse neste estudo foi o SLC1A2, receptor de glutamato relacionado ao controle de influxo de cálcio. A metilação em sítios de sua região promotora sofre influência da adicção ao álcool e nicotina em portadores de TB (Jia et al., 2017). A mesma variante investigada nesse estudo foi encontrada em associação com Esquizofrenia (Zhang et al., 2015) e em associação com resposta ao lítio (Dallaspezia et al., 2012). Essa variante apareceu como uma das mais agrupadas em relação a modelo de interação por MDR. Mesmo que não de modo significativo, pode ser indicativo de uma maior importância dentre as demais variantes. Ainda, esse gene não faz parte das conexões de rede centrais, sendo portanto associado ao resultado final das vias

moleculares às quais está conectado.

Foram encontradas associações em relação a resposta ao lítio que não se sustentaram em teste de comparação múltipla para AKT1 rs1130214 e foram marginais para rs3730358. Tendo em vista sua relação prévia com suicídio em TB, resposta a antidepressivos em DM, efeito colateral com antipsicóticos e início tardio de DM, essa variante se apresenta como marcador promissor em farmacogenética do lítio, embora não tenha sido investigada nesse contexto anteriormente.

BDNF e BCL2 estão intimamente ligados ao controle da dinâmica sináptica e de regulação negativa de apoptose respectivamente, ambos portanto associados a neuroplasticidade e neuroproteção. Sua maior expressão se relaciona à presença de lítio e é influenciada por mecanismos dependentes da ação de AKT1, GSK3B e MTOR. BDNF tem mecanismo de expressão complexa, com vários promotores e sofre modificações após sua tradução. O perfil de metilação do promotor IV em especial tem sido relacionado a ação de antidepressivos. Esse sítio tem maior importância pois quando hipometilado CREB se liga a ele induzindo transcrição. Há muitas evidências mostrando que neuroproteção e boa resposta terapêutica em DM depende de níveis aumentados de BDNF comparativamente ao início de tratamento. Observou-se neste estudo níveis muito baixos de metilação nos sítios investigados, o que também é encontrado em diversos estudos epigenéticos envolvendo essa região (Braithwaite et al., 2015). Contudo, ao se aplicar medidas de correção seus valores tenderam a zero, o que levantou suspeitas sobre questões técnicas envolvendo o processamento e leitura das amostras. Da mesma forma, ocorreu

com BCL2. Este gene possui 2 regiões promotoras localizadas acima de seu sítio de início de transcrição. Dada sua importância, optou-se por avaliar uma pequena região no início do segundo promotor, em uma ilha CpG, onde se ligam diversos fatores de transcrição.

Os sítios estudados de ambos os genes apresentam correlações negativas entre si, ou seja, uma posição com maior taxa de metilação no BLC2 (posição 3) se relaciona a menor metilação em BDNF cg23497217 e posição 3. Poderia se supor que isso reflita uma modulação entre efeito na expressão de ambos em favor da expressão de BDNF. Estudos *in vitro* mostram que ambos têm sua expressão aumentada na presença de lítio, o que até onde se conhece faria mais sentido se ambos estivessem hipometilados. Modelos animais submetidos a estresse crônico apresentam redução concomitante de BNDF e BCL2 e aumento de BAX em hipocampo e córtex pré-frontal revertidos após uso de resveratrol (Wang et al., 2016). Especificidades celulares podem responder por essas supostas discrepâncias. Por exemplo, neurônios do gânglio espiral quando apresentam expressão aumentada de BCL2 são protegidos de sofrerem apoptose porém isto inibe o crescimento de axônios e dendritos. Na presença de BDNF e NT-3, que promovem sobrevivência dessas células, o aumento da expressão de BCL2 induz apoptose, havendo uma correlação negativa entre ambos na manutenção desse tipo celular (Renton et al., 2010). Todavia não houve associação de ambos com resposta ao lítio, podendo os achados refletir regulação por outros estímulos ou mesmo refletindo efeitos de outras medicações usadas pelos pacientes.

Considerou-se também a avaliação do comprimento dos telômeros, que

se associa ao envelhecimento celular e tem sido alvo de investigação quanto a sua relação com doenças crônicas, estresse, estilo de vida e reposta medicamentosa. Essa relação provavelmente é bidirecional, contudo há achados sugestivos de que na presença de doenças associadas a estresse psicológico o encurtamento está acelerado e que lítio atenuaria esse processo. A enzima catalítica do complexo que regula o tamanho dos telômeros sofre influência em sua expressão através de ativação de vias associadas ao mecanismo de ação do lítio, bem como influencia a expressão de genes ligados a essas mesmas vias. Os telômeros estariam dessa forma no centro de uma rede formada por diferentes níveis mediando variações genética e epigenéticas, influências ambientais, processo de adoecimento e envelhecimento, resposta a fármacos, através da capacidade de proteção do DNA.

TL mostrou-se associado a variações genotípicas e alélicas relacionadas ao gene MTOR nesta amostra. Genótipos AG de rs1883965 e alelo C de rs1034528 associaram-se a maior comprimento de telômeros ($p = 0,010$ e $p = 0,041$, respectivamente). Em cérebro de camundongos a expressão de TERT se reduz com a idade e o acúmulo de ROS proveniente do processo mitocondrial aumenta. A perda dessa homeostasia pode ser reparada com indução de mecanismo de autofagia por restrição dietética ou por inibição de MTOR, o que causa acúmulo de TERT nas mitocôndrias e reduz a liberação de ROS. Essa ação não canônica de TERT já foi reconhecida em cérebros de pacientes com Doença de Alzheimer (Miwa; Saretzki, 2017). Como essas variantes ainda não foram associadas à diferenciação de expressão de MTOR em cérebro, embora sejam eQTLs em outros tecidos, a associação encontrada pode trazer impacto

em diferentes aspectos clínicos relacionados às doenças neurodegenerativas.

O LTL não foi associado a resposta ao lítio, mas mostrou estranhamente correlação positiva com idade na época da coleta e correlação positiva com tentativas prévias de suicídio. Martinsson et al. (2013) foram os primeiros a demonstrarem associação positiva entre TL e uso de lítio por mais de 30 meses (r^2= 0,13, p = 0,031) e com resposta terapêutica (p = 0,047). Squassina et al. (2016) mostraram igualmente correlação entre tempo de uso de lítio acima de 2 anos e TL (ρ =0,17; p = 0,037), sugerindo um contraponto ao efeito de exposição crônica a fatores promotores do encurtamento telomérico. Como está sujeito a diferentes influências, as associações consistentes encontradas na literatura dizem respeito à idade, estresse crônico e doenças crônicas ligadas à idade. O comprimento dos telômeros tem natureza poligênica assim como a farmacogenética do lítio. A regulação do seu comprimento compartilha de múltiplas vias associadas ao mecanismo de ação do lítio. Dado os achados nestes e outros estudos credita- se ao lítio um potencial papel de retardar senescência celular (Coutts et al., 2019).

Esperava-se portanto neste estudo uma correlação negativa entre idade e TL, mas obteve-se o contrário. Do mesmo modo ocorreu em relação à história de tentativa de suicídio. Provavelmente estes achados devem refletir a substrutura da amostra em relação a outros fatores correlacionados ao comprimento do telômero. Os grupos de resposta também não diferiram entre si com relação ao TL, nem o tempo de uso de lítio foi determinante, mesmo quando se controlou por idade na coleta e sexo. Esperava-se também uma relação negativa com qualquer situação estressora de vida, como já observado em

diferentes estudos. O encurtamento do telômero tem sido mais acelerado em mulheres do que em homens e sua preservação não se associa a hormônios esteróides masculinos (Coburn et al., 2018).

Assim como o pirossequenciamento, as técnicas laboratoriais e métodos para medição de telômeros são sujeitas a erros, com diferenças entre as metodologias utilizadas no sequenciamento e medição (Nettle et al., 2019), podendo resultar em dados questionáveis. A metodologia utilizada neste estudo é similar às utilizadas nos estudos de Martinsson et al. (2013).

Algumas associações surgiram nas análises e merecem ser exploradas. A associação obtida com quadro demencial e pior resposta chama a atenção uma vez que está de acordo com a hipótese de neuroprogressão da doença. Todavia, a amostra é bastante estratificada e com poucos idosos para construir uma hipótese frente a associação estatística. Uma amostra constituída de pacientes com mais de 3 décadas de tratamento poderia ser mais informativa.

Homens apresentaram maior pontuação na escala Alda em relação às mulheres. Este fato pode se dever a disparidades na frequência entre os sexos da amostra, ou representar a tendência já observada em literatura da presença de episódios depressivos mais comumente em mulheres. Associa-se a isso a melhor resposta ao lítio nos quadros maníacos predominantemente presentes no sexo masculino. Por fim, a associação de uso de álcool e taxa de metilação em BCL2 provavelmente é espúria, devendo-se levar em consideração que uso de álcool não necessariamente estava sendo feito no momento da coleta.

Embora os resultados não tenham sido positivos, considera-se que os objetivos inicialmente propostos tenham sido alcançados parcialmente. Em virtude de importantes dificuldades técnicas uma pequena proporção dos pacientes puderam ser avaliados em relação ao perfil de metilação e os dados obtidos não são passíveis de maiores interpretações. Os métodos utilizados para reagrupamento da amostra com intuito de verificar interação entre variantes polimórficas e taxa de metilação em sítios específicos na determinação da resposta terapêutica não resultou eficaz, tampouco a aplicação do método MDR.

Implicações quanto ao tamanho da amostra, avaliação retrospectiva de resposta terapêutica, estratificação genética da população brasileira, ausência de dados confiáveis na categorização de algumas variáveis para diversos casos, podem evidentemente comprometer os testes de associação. Essa parece ser a norma em todos os estudos de farmacogenética não prospectivos. Entretanto, acredita-se que maior conhecimento tenha sido agregado ao montante crescente de informações sobre resposta ao lítio e variabilidade genética na população.

Importantes questões advêm da precisão diagnóstica em TB. Mesmo incluindo apenas portadores do tipo I, com pelo menos 1 episódio de mania ao longo da vida, ainda se observa uma heterogeneidade em sua evolução e manifestação fenotípica. Alternativa para avaliação de resposta seria considerar o efeito sobre sintomas específicos ou sobre tipo de episódios ou ainda sobre características psicóticas, mistas e ideação/comportamento suicida. Essas associações foram testadas mas não foram consideradas em virtude da ausência desse tipo de informação para grande parte dos casos válidos. Com o

aumento da casuística possivelmente haverá tamanho amostral suficiente para testar essas relações.

7 CONCLUSÕES

Não se conseguiu nesta amostra encontrar interações específicas entre variantes polimórficas e sítios de metilação correlacionadas à resposta terapêutica de modo que se pudesse implementá-las como fator preditivo de resposta ao lítio a longo prazo. Conseguiu-se obter algumas associações que merecem ser melhor investigadas quanto ao seu papel funcional nas vias de sinalização envolvendo lítio. Frente aos achados acredita- se ter contribuído com novas informações a respeito de questões muitas vezes aflitivas aos clínicos que se deparam com o desafio de escolher o melhor tratamento farmacológico para seus pacientes. Apesar da existência de testes farmacogenéticos comercializados, ainda não há como se beneficiar deles na prática clínica além de considerações acerca de sua metabolização.

A aplicação da medicina de precisão em psiquiatria deverá percorrer caminho semelhante ao trilhado pela oncologia em níveis moleculares e utilizar de múltiplos níveis sistêmicos de interação. Esforços têm sido feitos neste sentido. A crescente eficiência das técnicas em genotipagem, a agregação de dados provenientes dos campos de transcriptoma e proteoma possibilitarão ampliar o conhecimento das interações e da dinâmica genômica envolvida na resposta ao tratamento. Avaliar melhor os mecanismos de regulação epigenética, a relação entre mecanismos genômicos e terapias não farmacológicas (psicoterapia, terapia com caixas de luz, estimulação magnética, eletroconvulsoterapia) e a utilização da estratificação genética nos estudos de neuroimagem trazem a perspectiva de refinar ainda mais o

tratamentopsiquiátrico. O acesso a grande banco de dados públicos formados por estudos utilizando tecnologias de *high-throughput sequencing* e a manipulação dos mesmos com uso de programas de bioinformática revelam a importância de diferentes vias de sinalização e proteínas candidatas a investigações mais aprofundadas sobre o tamanho de seu efeito na função farmacológica.

Em virtude da quantidade de informações e interações possíveis, o domínio da ciência de dados e de modelagem estatística permitirão criar algoritmos de resposta complexos que contemplam múltiplas variáveis e diferentes tipos de fenótipo de resposta. Ainda assim, a capacidade de estabelecer uma aliança terapêutica e organizar as informações de modo único e em benefício do paciente, apenas o médico a terá.

8 ANEXOS

Anexo A: Critérios Retrospectivos da Resposta Terapêutica de Longo Prazo em Pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar

APPENDIX 01 – BRAZILIAN VERSION OF THE ALDA SCALE

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

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

Critério A	**Critérios B**
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. **10** = Resposta completa. Sem recorrência na vigência de tratamento adequado, sem sintomas residuais, recuperação funcional completa **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 **8** = Ótima resposta. Atividade da doença reduzida mais que 90% **7** = Boa resposta. Atividade da doença reduzida em 80-90% **6** = Boa resposta. Atividade da doença reduzida em 65-80% **5** = Resposta moderada. Atividade da doença reduzida em 50-65% **4** = Resposta moderada. Atividade da doença reduzida em 35-50% **3** = Melhora leve. Atividade da doença reduzida em 20-35% **2** = Melhora leve. Atividade da doença reduzida em 10-20% **1** = Melhora mínima. Atividade da doença reduzida em 0-10% **0** = Sem mudança ou piora **Total de pontos Critério A:** _____	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. **B1: Número de episódios antes do tratamento:** 0 = 4 ou mais episódios 1 = 2 ou 3 episódios 2 = 1 episódio **B1:** _____ **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:** _____ **B3: Duração do tratamento:** 0 = 2 ou mais anos 1 = 1 a 2 anos 2 = Menos que 1 ano **B3:** _____ **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:** _____ **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:** _____ **Total de pontos Critérios B:** _____ **Total de pontos da escala (subtrair B de A):** _____

Anexo B: Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

MEDICINA
USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/09/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **244/15** intitulado**: "ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE RESPOSTA TERAPÊUTICA AO LÍTIO EM TRANSTORNO BIPOLAR E INTERAÇÃO ENTRE VARIANTES POLIMÓRFICAS COM MECANISMOS EPIGENÉTICOS"** apresentado pelo **Departamento de PSIQUIATRIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEPFMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Homero Pinto Vallada Filho
Pesquisador (a) Executante: Leandro Michelon

CEP-FMUSP, 23 de Setembro de 2015.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e-mail: cep.fm@usp.br

Anexo C: 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 Nº : ..... SEXO : .M □ F □ DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
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 (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **"ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE RESPOSTA TERAPÊUTICA AO LÍTIO EM TRANSTORNO BIPOLAR E INTERAÇÃO ENTRE VARIANTES POLIMÓRFICAS COM MECANISMOS EPIGENÉTICOS"**

2. PESQUISADOR : Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado 3 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 54439

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐ RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1.1. 1. *justificativa e os objetivos da pesquisa;* ***2****. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;* ***3****. desconfortos e riscos esperados;* ***4****. benefícios que poderão ser obtidos;* ***5.*** *informações sobre a utilização dos dados e material biológico obtido;* ***6****. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.*

1. Este estudo está sendo feito para que os médicos entendam melhor porque algumas pessoas portadoras de Transtorno Bipolar (TB) ficam muito bem dos sintomas da doença usando somente o lítio como medicação, enquanto outras pessoas precisam usar outros remédios associados ao lítio para controlar os sintomas. Todos sabem que as pessoas reagem de modo diferente a um mesmo remédio. Mas queremos poder dizer se o remédio vai fazer bem para um paciente antes mesmo de ele usar. Com isso vamos poder melhorar o tratamento dessa doença e diminuir o sofrimento porque conseguiremos uma recuperação mais rápida dos sintomas, usando a medicação mais certa para o paciente logo no início da doença. Uma forma de avaliar isto é estudar o DNA das pessoas e compará-lo entre as pessoas que respondem bem ao tratamento e as que não respondem conforme o esperado.

2. As pessoas que aceitarem participar deste estudo responderão a algumas perguntas e questionários durante uma consulta com um psiquiatra e serão submetidas à coleta de cerca de 20ml (2 a 4 tubinhos) de sangue de alguma veia do braço. Alguns questionários poderão ser respondidos em casa e entregues em tempo oportuno. O sangue será coletado por técnicos de enfermagem treinados para tal procedimento ou pelo próprio médico. Todas as informações sobre as pessoas que participarem do estudo serão mantidas em segredo, podendo ser utilizadas em outras pesquisas com o objetivo exclusivo de estudar a resposta a medicação e os fatores associados ao tratamento do Transtorno Bipolar.

3. O risco que a pessoa que aceitar participar do estudo terá é a possibilidade de sentir um desconforto com a picada da agulha para a retirada do sangue, que será feita através da punção periférica de veia preferencialmente do antebraço. Poderá aparecer uma mancha arroxeada na pele no local da picada, que sumirá em poucos dias. Todo o material usado será descartável.

4. As informações obtidas neste estudo poderão nos ajudar a entender melhor a diferença de resposta ao tratamento que observamos em portadores de TB. Isto auxiliará no desenvolvimento de procedimentos mais eficazes para tratar este problema mental, o que implica reduzir o sofrimento que os pacientes ainda passam até que se ache um remédio ou uma combinação de remédios que controle seus sintomas. Os possíveis benefícios decorrentes da pesquisa virão a longo prazo de forma coletiva.

5. Os dados de entrevista e o material biológico (DNA e soro) coletados poderão ser armazenados em condições adequadas para que novos estudos sobre a relação entre resposta ao tratamento e genética e estudos da relação entre desenvolvimento de doença de humor e genética possam ser realizados. Outra possibilidade de utilização do material está relacionada a colaboração com pesquisadores internacionais, com o intuito de ampliar as amostras e assim ter maior probabilidade de descobrirmos as respostas que procuramos. De qualquer modo o compromisso ético assumido de confidencialidade e acesso a informação será rigorosamente mantido. Em relação a novos estudos, você: ***( ) não autoriza a utilização dos seus dados e amostras; ( ) deseja ser contatado para autorização de utilização de seus dados e amostras antes do início de novos estudos; ( ) dispensa novo contato e já autoriza a utilização de seus dados e amostras em futuros estudos.***

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Ao sujeito que decidir participar desta pesquisa estará garantido:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios e resultados finais relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade de assistência que esteja recebendo.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

4. não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

5. os dados e o material coletados somente serão utilizados conforme desejo e autorização consignada no item 5 do parágrafo anterior.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

O principal investigador é o Dr Homero Pinto Vallada Filho que pode ser encontrado no endereço R. Dr. Ovídio Pires de Campos, 785 - 3º andar - PROGENE - tel: 2661-7129.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE RESPOSTA TERAPÊUTICA AO LÍTIO EM TRANSTORNO BIPOLAR E INTERAÇÃO ENTRE VARIANTES POLIMÓRFICAS COM MECANISMOS EPIGENÉTICOS**".

Eu discuti com o Dr. Homero Pinto Vallada Filho 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. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal data

_____ _____/____/____

assinatura de testemunha* data

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

* menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiencia auditiva ou visual.

9 REFERÊNCIAS

Abdolmaleky HM, Pajouhanfar S, Faghankhani M, Joghataei MT, Mostafavi A, Thiagalingam S. Antipsychotic drugs attenuate aberrant DNA methylation of DTNBP1 (dysbindin) promoter in saliva and post-mortem brain of patients with schizophrenia and Psychotic bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2015; Dec;168(8):687-96.

Agnew-Blais J, Danese A. Childhood maltreatment and unfavourable clinical outcomes in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. Lancet Psychiatry. 2016; Apr;3(4):342-9.

Ahn SW, Baek JH, Yang SY, Kim Y, Cho Y, Choi Y, Lee K, Park T, Hong KS. Long-term response to mood stabilizer treatment and its clinical correlates in patients with bipolar disorders: a retrospective observational study. Int J Bipolar Disord. 2017 Dec;5(1):24.

Aiff H, Attman PO, Aurell M, Bendz H, Ramsauer B, Schön S, Svedlund J. Effects of 10 to 30 years of lithium treatment on kidney function. J Psychopharmacol. 2015; May; 29(5):608-14.

AlAqeel B, Margolese HC. Remission in schizophrenia: critical and systematic review. Harv Rev Psychiatry. 2012; Nov-Dec:20(6):281-97.

Albanese MJ, Pies R. The bipolar patient with comorbid substance use disorder: recognition and management.CNS Drugs. 2004;18(9):585-96.

Alda M, Shao L, Wang JF, Lopez de Lara C, Jaitovich-Groisman I, Lebel V, et al. Alterations in phosphorylated cAMP response element-binding protein (pCREB) signaling: an endophenotype of lithium-responsive bipolar disorder? Bipolar Disord. 2013; Dec:15(8):824-31.

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

Alda M. Pharmacokinetics of lithium. In: Bauer M, Grof P, Müller-Oerlinghausen B, editors. Lithium in neuropsychiatry – the comprehensive guide. London/Abingdon: Informa Healthcare. 2006;321–8.

Alda M. Who are excellent lithium responders and why do they matter? World Psychiatry. 2017; Oct;16(3):319-320.

Aldinger F, Schulze TG. Environmental factors, life events, and trauma in the course of bipolar disorder. Psychiatry Clin Neurosci. 2017; Jan;71(1):6-17.

Alghamdi BS. The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders. J Neurosci Res. 2018 Jul;96(7):1136-1149.

Aminzadeh A, Dehpour AR, Safa M, Mirzamohammadi S, Sharifi AM. Investigating the protective effect of lithium against high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and apoptotic mitochondria pathway. Cellular and Molecular Neurobiology. 2014;34(8):1143–50.

Andreasen NC, Carpenter WT Jr, Kane JM, Lasser RA, Marder SR, Weinberger DR. Remission in schizophrenia: proposed criteria and rationale for consensus. Am J Psychiatry. 2005; Mar:162(3):441-9.

Andrews SV, Ellis SE, Bakulski KM, Sheppard B, Croen LA, Hertz-Picciotto I, Newschaffer CJ, Feinberg AP, Arking DE, Ladd-Acosta C, Fallin MD. Cross-tissue integration of genetic and epigenetic data offers insight into autism spectrum disorder. Nat Commun. 2017 Oct 24;8(1):1011.

Angst J, Gamma A, Sellaro R, Lavori PW, Zhang H. Recurrence of bipolar disorders and major depression: a life-long perspective. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2003; 253(5):236–40.

Arrázola MS, Alvarez CM, Inestrosa NC. How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario. Front Cell Neurosci. 2015; 9:166.

Asai T, Bundo M, Sugawara H, Sunaga F, Ueda J, Tanaka G, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K.Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. Int J Neuropsychopharmacol. 2013; Nov;16(10):2285-94.

Atagün Mİ. Brain oscillations in bipolar disorder and lithium-induced changes. Neuropsychiatr Dis Treat. 2016 Mar 7; 12:589-601.

Athanasiou MC, Dettling M, Cascorbi I, Mosyagin I, Salisbury BA, Pierz KAet al. Candidate gene analysis identifies a polymorphism in HLA-DQB1 associated with clozapine-induced agranulocytosis. The Journal of clinical psychiatry. 2011; Apr:72(4):458–63.

Averous P, Charbonnier E, Lagouanelle-Simeoni MC, Prosperi A, Dany L. Illness perceptions and adherence in bipolar disorder: An exploratory study. Compr

Psychiatry. 2018; Jan; 80:109-15.

Azorin JM, Kaladjian A, Adida M, Fakra E. Late-onset bipolar illness: the geriatric bipolar type VI.CNS Neurosci Ther. 2012; Mar;18(3):208-13.

Backlund L, Wei YB, Martinsson L, Melas PA, Liu JJ, Mu N, et al. Mood stabilizers and the influence on global leukocyte DNA methylation in bipolar disorder.Mol Neuropsychiatry. 2015; Jul;1(2):76-8.

Baethge C, Smolka MN, Gruschka P, Berghöfer A, Schlattmann P, Bauer M, et al. Does prophylaxis- delay in bipolar disorder influence outcome? Results from a long-term study of 147 patients. Acta Psychiatr Scand. 2003;107(4):260–7.

Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, Wittnam J, Held T, Bähr M, et al. HDAC1 regulates fear extinction in mice. J Neurosci. 2012;32(15):5062-73.

Baird-Gunning J, Lea-Henry T, Hoegberg LCG, Gosselin S, Roberts DM. Lithium Poisoning. J Intensive Care Med. 2017; May:32(4):249-63.

BALANCE investigators and collaborators, Geddes JR, Goodwin GM, Rendell J, Azorin JM, Cipriani A, Ostacher MJ, Morriss R, Alder N, Juszczak E. Lithium plus valproate combination therapy versus monotherapy for relapse prevention in bipolar I disorder (BALANCE): a randomised open-label trial. Lancet. 2010;375(9712):385–395

Baldessarini RJ, Tondo L, Davis P, Pompili M, Goodwin FK, Hennen J. Decreased risk of suicides and attempts during long-term lithium treatment: a meta-analytic review. Bipolar Disord. 2006 Oct;8(5 Pt 2):625-39.

Baldessarini RJ, Undurraga J, Vazquez GH, Tondo L, Salvatore P, Ha Ket al Predominant recurrence polarity among 928 adult international bipolar I disorder patients. Acta PsychiatrScand. 2012; 125:293–302.

Barret JH, Iles MM, Dunning AM, Pooley KA. Telomere length and common disease: study design and analytical challenges. Published online 2015; May19. doi: 10.1007/s00439-015-1563-4

Barrett JH, Iles MM, Dunning AM, Pooley KA. Telomere length and common disease: study design and analytical challenges. Hum Genet. 2015; Jul:134(7):679-89.

Baskaran A, Milev R, McIntyre RS. The neurobiology of the EEG biomarker as a predictor of treatment response in depression. Neuropharmacology. 2012; 63:507–13.

Bauer IE, Meyer TD, Sanches M, Zunta-Soares G, Soares JC. Does a history of substance abuse and illness chronicity predict increased impulsivity in bipolar disorder? Journal of Affective Disorders. 2015; 179:142-7.

Bauer M, Andreassen OA, Geddes JR, Vedel Kessing L, Lewitzka U, Schulze TG, Vieta E. Areas of uncertainties and unmet needs in bipolar disorders: clinical and research perspectives. Lancet Psychiatry. 2018; Nov;5(11):930-939.

Bauer M, Gitlin M. What is lithium and how does it work? In: The essential guide to lithium treatment. Springer International Publishing. 2016;33–43.

Bauer M, Juckel G, Correll CU, Leopold K, Pfennig A. Diagnosis and treatment in the early illness phase of bipolar disorders. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2008; Nov;258 Suppl 5:50-4.

Bellivier F, Delavest M, Coulomb S, Figueira ML, Langosch JM, Souery D, Vieta E. Therapeutic management of bipolar disorder in France and Europe: a multinational longitudinal study (WAVE-bd). Encephale. 2014;Oct;40(5):392-400.

Belzeaux R, Bergon A, Jeanjean V, Loriod B, Formisano-Tréziny C, Verrier L, et al. Responder and nonresponder patients exhibit different peripheral transcriptional signatures during major depressive episode. Transl Psychiatry. 2012;2:e185.

Benard V, Vaiva G, Masson M, Geoffroy PA. Lithium and suicide prevention in bipolar disorder. Encephale. 2016 Jun;42(3):234-41

Bender RE, Alloy LB. Life stress and kindling in bipolar disorder: review of the evidence and integration with emerging biopsychosocial theories. Clin Psychol Rev. 2011; Apr;31(3):383-98.

Benedetti F, Serretti A, Pontiggia A, Bernasconi A, Lorenzi C, Colombo C, Smeraldi E. Long-term response to lithium salts in bipolar illness is influenced by the glycogen synthase kinase 3-beta -50 T/C SNP. Neurosci Lett. 2005;376(1):51–5.

Bennabi D, Aouizerate B, El-Hage W, Doumy O, Moliere F, Courtet P, et al. Risk factors for treatment resistance in unipolar depression: A systematic review. J Affect Disord. 2015; Oct8:171C:137-41.

Berghöfer A, Alda M, Adli M, Baethge C, Bauer M, Bschor T, et al. Long-term effectiveness of lithium in bipolar disorder: a multicenter investigation of patients with typical and atypical features. J Clin Psychiatry. 2008; 69:1860-8.

Berghöfer A, Alda M, Adli M, Baethge C, Bauer M, Bschor T, et al. Stability of lithium treatment in bipolar disorder – long-term follow-up of 346 patients. Int J Bipolar Disord. 2013;31(1):1.

Bergmans RS, Kelly KM, Mezuk B. Inflammation as a unique marker of suicide ideation distinct from depression syndrome among U.S. adults. J Affect Disord. 2019; Feb15:245:1052-60.

Berk M, Dandash O, Daglas R, Cotton SM, Allott K, Fornito A, et al. Neuroprotection after a first episode of mania: a randomized controlled maintenance trial comparing the effects of lithium and quetiapine on grey and white matter volume. Transl Psychiatry. 2017 Feb 21;7(2):e1041.

Berk M, Post R, Ratheesh A, Gliddon E, Singh A, Vieta E, et al. Staging in bipolar disorder: from theoretical framework to clinical utility. World Psychiatry. 2017; Oct;16(3):236–44.

Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. Pharmacol Ther. 2015; Apr 0:114–31.

Beurel E. Regulation of inflammation and T cells by glycogen synthase kinase-3: links to mood disorders. Neuroimmunomodulation. 2014;21(0):140–4.

Bilsland AE, Hoare S, Stevenson K, Plumb J, Gomez-Roman N, Cairney C, et al. Dynamic telomerase gene suppression via network effects of GSK3 inhibition. PLoSOne. 2009; Jul31;4(7):e6459.

Bocchio-Chiavetto L, Maffioletti E, Bettinsoli P, Giovannini C, Bignotti S, Tardito D, Corrada D, Milanesi L, Gennarelli M. Blood microRNA changes in depressed patients during antidepressant treatment. Eur Neuropsychopharmacol. 2013; 23:602-11.

Boks MP, Jong NM, Kas MJH, Vinkers CH, Fernandes C, Kahn RS, Mill J, Ophoffl RA. Current status and future prospects for epigenetic psychopharmacology Epigenetics. 2012; 7(1):20-8.

Borre L, Andreassen TF, Shi L, Weinstein H, Gether U. The second sodium site in the dopamine transporter controls cation permeation and is regulated by chloride.J Biol Chem. 2014;Sep12:289(37):25764-73.

Bradley CA, Peineau S, Taghibiglou C, Nicolas CS, Whitcomb DJ, Bortolotto ZA, et al. A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. Front Mol Neurosci. 2012; Feb15;5:13.

Brami-Cherrier K, Anzalone A, Ramos M, Forne I, Macciardi F, Imhof A, Borrelli E. Epigenetic reprogramming of cortical neurons through alteration of dopaminergic circuits. Mol Psychiatry. 2014;19(11):1193-200.

Brandl EJ, Kennedy JL, Muller DJ. Pharmacogenetics of Antipsychotics. Can J Psychiatry. 2014;59(2):76–88.

Brundin L, Bryleva EY, Rajamani KT. Role of Inflammation in suicide: from mechanisms to treatment. Neuropsychopharmacology. 2017;Jan:42(1):271–83.

Carli M, Morissette M, Hébert C, Di Paolo T, Reader TA. Effects of a chronic lithium treatment on central dopamine neurotransporters. Biochem Pharmacol. 1997 Aug 1;54(3):391-7.

Carrà G, Bartoli F, Crocamo C, Brady KT, Clerici M. Attempted suicide in people with co-occurring bipolar and substance use disorders: Systematic review and meta-analysis. Journal of Affective Disorders. 2014; 167:125-35.

Breen MS, White CH, Shekhtman T, Lin K, Looney D, Woelk CH, Kelsoe JR. Lithium-responsive genes and gene networks in bipolar disorder patient-derived lymphoblastoid cell lines. The Pharmacogenomics Journal. 2016;16(5):446-53.

Burghardt KJ, Goodrich JM, Dolinoy DC, Ellingrod VL. DNA methylation, insulin resistance and second-generation antipsychotics in bipolar disorder. Epigenomics. 2015; 7:343–52.

Carvalho AF, Dimellis D, Gonda X, Vieta E, McIntyre RS, Fountoulakis KN. Rapid cycling in bipolar disorder: a systematic review.J Clin Psychiatry. 2014 Jun;75(6):e578-86.

Carvalho AF, McIntyre RS, Dimelis D, Gonda X, Berk M, Nunes-Neto PR, et al. Predominant polarity as a course specifier for bipolar disorder: a systematic review. Affect Disord. 2014; Jul; 163:56-64.

Castellani RJ, Perry G. Tau biology, tauopathy, traumatic brain injury, and diagnostic challenges. J Alzheimers Dis. 2019;67(2):447–67.
Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res. 2002 May 15; 30(10): e47.

Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. Nucleic Acids Res. 2009 Feb;37(3):e21.

Cecon E, Chen M, Marçola M, Fernandes PA, Jockers R, Markus RP. Amyloid β peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. FASEB J. 2015; Jun:29(6):2566-82.

Chen CH, Lee CS, Lee MT, Ouyang WC, Chen CC, Chong MY, et al. Taiwan Bipolar Consortium. Variant GADL1 and response to lithium therapy in bipolar I disorder. N Engl J Med. 2014; 370:119-28.

Chen M, Fitzgerald HM, Madera JJ, Tohen M. Functional outcome assessment in bipolar disorder: A systematic literature review. Bipolar Disord. 2019 May; 21(3):194-214.

Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, Kanai H, Hough C, Hiroi T, Leeds P. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. Bipolar Disord. 2002; Apr;4(2):129-36.

Çinar KR. Telomere length and hTERT in mania and subsequent remission. Braz J Psychiatry. 2018 Jan-Mar;40(1):19-25.

Cipriani A, Hawton K, Stockton S, Geddes JR. Lithium in the prevention of suicide in mood disorders: updated systematic review and meta-analysis.BMJ. 2013; Jun 27; 346:f3646.

Clemente AS, Diniz BS, Nicolato R, Kapczinski FP, Soares JC, Firmo JO, Castro-Costa É. Bipolar disorder prevalence: a systematic review and meta-analysis of the literature.Braz J Psychiatry. 2015;Apr-Jun;37(2):155-61.

Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The amyloid-β oligomer hypothesis: beginning of the third decade. J Alzheimers Dis. 2018;64(s1):S567-S610.

Coburn SB, Graubard BI, Trabert B, McGlynn KA, Cook MB. Associations between circulating sex steroid hormones and leukocyte telomere length in men in the National Health and Nutrition Examination Survey. Andrology. 2018 Jul;6(4):542-546.

Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JLet al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. Nat Genet. 2013; 45:422–7.

Col SE, Caykoylu A, Karakas Ugurlu G, Ugurlu M. Factors affecting treatment compliance in patients with bipolar I disorder during prophylaxis: a study from Turkey. Gen Hosp Psychiatry. 2014;36(2):208–13.

Colpo GD, Leffa DD, Köhler CA, Kapczinski F, Quevedo J, Carvalho AF. Is bipolar disorder associated with accelerating aging? A meta-analysis of telomere length studies. J Affect Disord. 2015; Nov; 186:241-8.

Coryell W, Turvey C, Endicott J, Leon AC, Mueller T, Solomon D, Keller M. Bipolar I affective disorder: predictors of outcome after 15 years. J Affect Disord. 1998;50(2-3):109-16.

Coutts F, Palmos AB, Duarte Rodrigo RR, Jong S, Lewis CM, Dima D, Powell TR. The polygenic nature of telomere length and the anti-ageing properties of lithium. Neuropsychopharmacology. 2019; 44:757–65.

Danho. Systems pharmacology: towards the modeling of network interactions. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016;94;4-14.

D'Addario C, Dell'Osso B, Palazzo MC, Benatti B, Lietti L, Cattaneo E, et al. Selective DNA methylation of BDNF promoter in bipolar disorder: differences among patients with BDI and BDII. Neuropsychopharmacology. 2012; Jun;37(7):1647-55.

D'Addario C, Palazzo MC, Benatti B, Grancini B, Pucci M, Di Francesco A, et al.Regulation of gene transcription in bipolar disorders: Role of DNA methylation in the relationship between prodynorphin and brain derived neurotrophic factor.Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry. 2018; Mar:2; 82:314-21.

Dallaspezia S, Poletti S, Lorenzi C, Pirovano A, Colombo C, Benedetti F. Influence of an interaction between lithium salts and a functional polymorphism in SLC1A2 on the history of illness in bipolar disorder. Mol Diagn Ther. 2012 Oct;16(5):303-9.

Darrow SM, Verhoeven JE, Révész D, Lindqvist D, Penninx BWJH, Delucchi KL, et al. The association between psychiatric disorders and telomere length: a meta-analysis involving 14,827 persons. Psychosom Med. 2016; 78:776–87.

De Fazio P, Gaetano R, Caroleo M, Pavia M, De Sarro G, Fagiolini A, Segura-Garcia C. Lithium in late-life mania: a systematic review. NeuropsychiatrDisTreat. 2017; 13:755-766.

Dell'Osso B, D'Addario C, Carlotta Palazzo M, Benatti B, Camuri G, Galimberti D, et al. Epigenetic modulation of BDNF gene: differences in DNA methylation between unipolar and bipolar patients. Journal of affective disorders. 2014; 166:330–3.

De-Paula VJ, Kerr DS, Scola G, Gattaz WF, Forlenza OV. Lithium distinctly modulates the secretion of pro- and anti- inflammatory interleukins in co-cultures of neurons and glial cells at therapeutic and sub-therapeutic concentrations. Curr

Alzheimer Res. 2016;13(8):848-52.

De Vincenti AP, Ríos AS, Paratcha G, Ledda F. Mechanisms That Modulate and Diversify BDNF Functions: Implications for Hippocampal Synaptic Plasticity. Front Cell Neurosci. 2019 Apr 9;13:135.

Devlin B, Roeder K, Bacanu SA. Unbiased methods for population-based association studies. Genet Epidemiol. 2001 Dec;21(4):273-84.

Di Meo S,Reed TT,Venditti P,Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016: 1245049.

de Sousa RT, van de Bilt MT, Diniz BS, Ladeira RB, Portela LV, Souza DO, Forlenza OV, Gattaz WF, Machado-Vieira R. Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. Neurosci Lett. 2011 Apr 20;494(1):54-6.

Dimitrova A, Milanova V, Krastev S, Nikolov I, Toncheva D, Owen MJ, Kirov G. Association study of myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) polymorphisms with bipolar affective disorder and response to lithium treatment. Pharmacogenom J. 2005;5(1):35–41.

Dmitrzak-Weglarz M, Rybakowski JK, Suwalska A, Skibinska M, Leszczynska-Rodziewicz A, Szczepankiewicz A, Hauser J. Association studies of the BDNF and the NTRK2 gene polymorphisms with prophylactic lithium response in bipolar patients. Pharmacogenomics. 2008;9(11):1595–603.

Domschke K, Tidow N, Schwarte K, Deckert J, Lesch KP, Arolt V, Zwanzger P, Baune BT. Serotonin transporter gene hypomethylation predicts impaired antidepressant treatment response. Int J Neuropsychopharmacol. 2014; Aug;17(8):1167-76.

Domschke K, Tidow N, Schwarte K, Ziegler C, Lesch KP, Deckert J, Arolt V, Zwanzger P, Baune BT. Pharmacoepigenetics of depression: no major influence of MAO-A DNA methylation on treatment response. J Neural Transm. 2014; May 10.

Donati RJ, Schappi J, Czysz AH, Jackson A, Rasenick MM. Differential effects of antidepressants escitalopram versus lithium on Gs alpha membrane relocalization.BMC Neurosci. 2015;Jul11:16:40.

Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A.Valproate induces DNA

demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain.Epigenetics. 2010; Nov-Dec;5(8):730-5.

Dong E, Grayson DR, Guidotti A, Costa E. Antipsychotic subtypes can be characterized by differences in their ability to modify GABAergic promoter methylation. Epigenomics. 2009;1(1):201-11.

D'Onofrio S,Hyde J,Garcia-Rill E. Interaction between neuronal calcium sensor protein 1 and lithium in pedunculopontine neurons. Physiol Rep. 2017; Apr:5(7): e13246.

Duffy A, Alda M, Milin R, Grof P. A consecutive series of treated affected offspring of parents with bipolar disorder: is response associated with the clinical profile? Can J Psychiatry. 2007; Jun;52(6):369-76.

Duffy A, Vandeleur C, Heffer N, Preisig M. The clinical trajectory of emerging bipolar disorder among the high-risk offspring of bipolar parents: current understanding and future considerations. Int J Bipolar Disord. 2017; 5:37.

Dugdale HL, Richardson DS. Heritability of telomere variation: it is all about the environment! Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018; Mar5:373(1741). pii: 20160450.

Dunner DL, Murphy D, Stallone F, Fieve RR. Episode frequency prior to lithium treatment in bipolar manic-depressive patients. Compr Psychiatry. 1979 Nov-Dec;20(6):511-5.

Dwivedi T, Zhang H.Lithium-induced neuroprotection is associated with epigenetic modification of specific BDNF gene promoter and altered expression of apoptotic-regulatory proteins. Front Neurosci. 2015; Jan14; 8:457.

Dwivedi Y. Evidence demonstrating role of in the etiopathology of major depression. J Chem Neuroanat. 2011; 42:142-56.

Edgar RD, Jones MJ, Meaney MJ, Turecki G, Kobor MS. BECon: a tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain. Transl Psychiatry. 2017 Aug 1;7(8):e1187.

EL-Mallakah S. Lithium: actions and mechanisms. American Psychatric Press, DC, 1996.

Elvsåshagen T, Vera E, Bøen E, Bratlie J, Andreassen OA, Josefsen D, et al. The load of short telomeres is increased and associated with lifetime number of depressive episodes in bipolar II disorder. J Affect Disord. 2011 Dec;135(1-3):43-50

Fan R, Wang Y, Mills JL, Wilson AF, Bailey-Wilson JE, Xiong M. Functional linear models for association analysis of quantitative traits. Genet Epidemiol.

2013;37(7):726-42.

Fass DM, Schroeder FA, Perlis RH, Haggarty SJ. Epigenetic mechanisms in mood disorders: targeting neuroplasticitty. Neuroscience. 2014; 264:112-30.

Fellinger M, Waldhör T, Blüml V, Williams N, Vyssoki B. Influence of gender on inpatient treatment for bipolar disorder: an analysis of 60,607 hospitalisations. Journal of Affective Disorders. 2018; 225:104-7.

Fiorentino A, Sharp SI, McQuillin A. Association of rare variation in the glutamate receptor gene SLC1A2 with susceptibility to bipolar disorder and schizophrenia. Eur J Hum Genet. 2015 Sep;23(9):1200-6.

Fletcher JL, Murray SS, Xiao J. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Central Nervous System Myelination: A New Mechanism to Promote Myelin Plasticity and Repair. Int J Mol Sci. 2018 Dec 19;19(12)

Foltran RB, Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin?J Neurochem. 2016; Jul:138(2):204-21.

Fornaro M, De Berardis D, Koshy AS, Perna G, Valchera A, Vancampfort D, Stubbs B. Prevalence and clinical features associated with bipolar disorder polypharmacy: a systematic review. Neuropsychiatr Dis Treat. 2016; Mar 31; 12:719-35.

Forty L, Ulanova A, Jones L, Jones I, Gordon-Smith K, Fraser C, et al. Comorbid medical illness in bipolar disorder. Br J Psychiatry. 2014; Dec; 205(6):465-72.

Freitas DM, Castro MMCA, Geraldes CFGC. Is Competition between Li+ and Mg2+ the underlying theme in the proposed mechanisms for the pharmacological action of lithium salts in bipolar disorder? A cc. C h e m. R e s. 2006; 39:283-91.

Frey BN, Andreazza AC, Houenou J, Jamain S, Goldstein BI, Frye MA, et al. Biomarkers in bipolar disorder: a positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. Aust N Z J Psychiatry. 2013; Apr:47(4):321-32.

Frye MA, Denicoff KD, Bryan AL, Smith-Jackson EE, Ali SO, Luckenbaugh D, Leverich GS, Post RM. Association between lower serum free T4 and greater mood instability and depression in lithium-maintained bipolar patients. Am. J. Psychiatry. 1999;156(12):1909–14.

Frye MA, Yatham L, Ketter TA, Goldberg J, Suppes T, Calabrese JR, et al. Depressive relapse during lithium treatment associated with increased serum

thyroid-stimulating hormone: results from two placebo-controlled bipolar I maintenance studies. Acta Psychiatr. 2009; 120(1):10–3.

Gajwani P. Treatment-refractory bipolar disorder: classification to aid in clinical management. Expert OpinPharmacother. 2009; Aug:10(12):1907-15.

Garcia-Rill E, D'Onofrio S, Mahaffey SC, Bisagno V, Urbano FJ. Bottom-up gamma and bipolar disorder, clinical and neuroepigenetic implications. Bipolar Disord. 2019;Mar:21(2):108-116.

Geddes JR, Burgess S, Hawton K, Jamison K, Goodwin GM. Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Am J Psychiatry. 2004;161(2):217–22.

Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. Lancet. 2013;381(9878):1672–82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60857-0.

Geoffroy PA, Etain B, Lajnef M, Zerdazi EH, Brichant-Petitjean C, Heilbronner U, et al. Circadian genes and lithium response in bipolar disorders: associations with PPARGC1A (PGC-1α) and RORA. Genes Brain Behav. 2016; Sep:15(7):660-8.

Geoffroy PA, Etain B, Scott J, Henry C, Jamain S, Leboyer M, Bellivier F. Reconsideration of bipolar disorder as a developmental disorder: importance of the time of onset. J Physiol Paris. 2013; Sep;107(4):278-85.

Geoffroy PA, Etain B, Sportiche S, Bellivier F. Circadian biomarkers in patients with bipolar disorder: promising putative predictors of lithium response. Int. J. Bipolar Disord. 2014;2(1):5.

Gitlin M. Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies. Int J Bipolar Disord. 2016 Dec;4(1):27.

Gitlin MJ. Lithium: An American Perspective. Pharmacopsychiatry. 2018 Sep;51(5):222-223

Goldberg JF, Harrow M. Consistency of remission and outcome in bipolar and unipolar mood disorders: a 10-year prospective follow-up. J Affect Disord. 2004; Aug :81(2):123-31.

Golden JC, Goethe JW, Woolley SB. Complex psychotropic polypharmacy in bipolar disorder across varying mood polarities: A prospective cohort study of 2712 inpatients. J Affect Disord. 2017 Oct 15; 221:6-10.

Goldstein MR, Mascitelli L. Is violence in part a lithium deficiency state? Med Hypotheses. 2016; Apr;89:40-2

Golic M, Aiff H, Attman PO, Ramsauer B, Schön S, Svedlund J. Compliance with the safety guidelines for long-term lithium treatment in Sweden. J Psychopharmacol. 2018 Oct;32(10):1104-1109.

Gong Q, Wu Q, Scarpazza C, Lui S, Jia Z, Marquand A, Huang X, McGuire P, Mechelli A. Prognostic prediction of therapeutic response in depression using high-field MR imaging. NeuroImage. 2011; 55:1497-1503.

González-Pinto A, Alberich S, Barbeito S, Alonso M, Vieta E, Martínez-Arán A, Saenz M, López P. Different profile of substance abuse in relation to predominant polarity in bipolar disorder The Vitoria long-term follow-up study. Journal of Affective Disorders. 2010; 124:250–5.

Goodwin FK. Rationale for long-term treatment of bipolar disorder and evidence for long-term lithium treatment.J Clin Psychiatry. 2002; 63:Suppl10:5-12.

Gordon D, Levenstien MA, Finch SJ, Ott J. Errors and linkage disequilibrium interact multiplicatively when computing sample sizes for genetic case-control association studies. Pac Symp Biocomput. 2003:490-501.

Greenberg S, Rosenblum KL, McInnis MG, Muzik M. The role of social relationships in bipolar disorder: a review. Psychiatry Research. 2014; 219:248-54.

Goud Alladi C, Etain B, Bellivier F, Marie-Claire C.DNA methylation as a biomarker of treatment response variability in serious mental illnesses: a systematic review focused on bipolar disorder, schizophrenia, and major depressive disorder. Int J Mol Sci. 2018;Oct 4;19(10):3026.

Greene M, Paladini L, Lemmer T, Piedade A, Touya M, Clark O. Systematic literature review on patterns of pharmacological treatment and adherence among patients with bipolar disorder type I in the USA. Neuropsychiatr Dis Treat. 2018 Jun 14; 14:1545-1559.

Grof P, Duffy A, Alda M, Hajek T. Lithium response across generations. Acta Psychiatr Scand. 2009; Nov:120(5):378-85.

Grof P. Sixty years of lithium responders. Neuropsychobiology. 2010;62(1):8-16.

Grof P, Duffy A, Cavazzoni P, Grof E, Garnham J, MacDougall M, O'Donovan C, Alda M. Is response to prophylactic lithium a familial trait? J Clin Psychiatry 2002; 63:942–7.

Gruber, J, Mazon LM. A Prevalência na utilização de medicamentos psicotrópicos no município de Mafra: um estudo retrospectivo. Saúde Meio Ambient. 2014; 3:1:44-50.

Guidotti A, Grayson DR. DNA methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. Dialogues Clin Neurosci. 2014;16(3):419-29.

Guney E, Oliva B. Analysis of the robustness of network-based disease-gene prioritization methods reveals redundancy in the human interactome and functional diversity of disease-genes. PLoS One. 2014;9(4):94686.

Guo Y, DuBois Bowman F, Kilts C. Predicting the brain response to treatment using a Bayesian hierarchical model with application to a study of schizophrenia. Hum Brain Mapp. 2008; 29:1092–1109.

Guo W, Nagappan G, Lu B. Differential effects of transient and sustained activation of BDNF-TrkB signaling. Dev Neurobiol. 2018 Jul;78(7):647-659.

Haddjeri N, Szabo ST, de Montigny C, Blier P. Increased tonic activation of rat forebrain 5-HT(1A) receptors by lithium addition to antidepressant treatments. Neuropsychopharmacology. 2000 Apr;22(4):346-56.

Hafeman DM, Chang KD, Garrett AS, Sanders EM, Phillips ML. Effects of medication on neuroimaging findings in bipolar disorder: an updated review.Bipolar Disord. 2012; Jun;14(4):375-410.

Hammett S, Youssef NA. Systematic review of recent guidelines for pharmacological treatments of bipolar disorders in adults.Ann Clin Psychiatry. 2017; Nov;29(4):266-282.

Han X, Yang L, Du H, Sun Q, Wang X, Cong L, Liu X, Yin L, Li S, Du Y. Insulin attenuates Beta-Amyloid-Associated insulin/Akt/EAAT signaling perturbations in human astrocytes. Cell mol neurobiol. 2016; Aug:36(6):851–64.

Hansson C, Joas E, Pålsson E, Hawton K, Runeson B, Landén M. Risk factors for suicide in bipolar disorder: a cohort study of 12 850 patients.Acta PsychiatrScand. 2018; Nov;138(5):456-463.

Heffner JL, DelBello MP, Anthenelli RM, Fleck DE, Adler CM, Strakowski SM. Cigarette smoking and its relationship to mood disorder symptoms and co-occurring alcohol and cannabis use disorders following first hospitalization for bipolar disorder.Bipolar Disord. 2012; Feb;14(1):99-108.

Hermida MA, DineshKumar J, Leslie NR. GSK3 and its interactions with the

PI3K/AKT/mTOR signalling network.Adv BiolRegul. 2017; Aug:65:5-15.

Higgins GA, Allyn-Feuer A, Barbour E, Athey BD. A glutamatergic network mediates lithium response in bipolar disorder as defined by epigenome pathway analysis. Pharmacogenomics. 2015;16(14):1547-63. doi: 10.2217.

Hong J, Reed C, Novick D, Haro JM, Aguado J. Clinical and economic consequences of medication non-adherence in the treatment of patients with a manic/mixed episode of bipolar disorder: results from the European Mania in Bipolar Longitudinal Evaluation of Medication (EMBLEM) study. Psychiatry Res. 2011;190(1):110–4.

Hou L, Heilbronner U, Degenhardt F, Adli M, Akiyama K, Akula N, et al. Genetic variants associated with response to lithium treatment in bipolar disorder: a genome-wide association study. Lancet. 2016; Mar12:387(10023):1085-93.

Houenou J, Benizri C, Jakubowicz B. Neuroimaging and lithium: the science and practice of lithium therapy. Springer. 2017;97–109.

Houtepen LC, van Bergen AH, Vinkers CH, Boks MP. DNA methylation signatures of mood stabilizers and antipsychotics in bipolar disorder. Epigenomics. 2016; 8:197–208.

Huang S, Tong H, Lei M, Zhou M, Guo W, Li G, Tang X, Li Z, Mo M, Zhang X, Chen X, Cen L, Wei L, Xiao Y, Li K, Huang Q, Yang X, Liu W, Zhang L, Qu S, Li S, Xu P. Astrocytic glutamatergic transporters are involved in Aβ-induced synaptic dysfunction. Brain Res. 2018; Jan1:1678:129-37.

Huang YC, Wang LJ, Tseng PT, Hung CF, Lin PY. Leukocyte telomere length in patients with bipolar disorder: An updated meta-analysis and subgroup analysis by mood status. Psychiatry Res. 2018 Dec; 270:41-49.

Hung CI, Wang SJ, Liu CY, Hsu SC, Yang CH. Comorbidities and factors related to discontinuation of pharmacotherapy among outpatients with major depressive disorder. Compr Psychiatry. 2011 Jul-Aug;52(4):370-7.

Hunsberger JG, Chibane FL, Elkahloun AG, Henderson R, Singh R, Lawson J, et al. Novel integrative genomic tool for interrogating lithium response in bipolar disorder.Transl Psychiatry. 2015; Feb; 5(2):504.

Hunt GE, Malhi GS, Cleary M, Lai HM, Sitharthan T. Comorbidity of bipolar and substance use disorders in national surveys of general populations, 1990-2015: Systematic review and meta-analysis. J Affect Disord. 2016; Dec; 206:321-30.

Hussain MU. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. Cell Tissue Res. 2012; 349:405-13.

Huzayyin AA, Andreazza AC, Turecki G, Cruceanu C, Rouleau GA, Alda M, Young LT. Decreased global methylation in patients with bipolar disorder who respond to lithium. Int J Neuropsychopharmacol. 2014; Apr:17(4):561-9.

Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Quevedo J. Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: insights in depression. Neuroscience. 2014; Sep5:275:455-68.

Ikeda A, Kato T. Biological predictors of lithium response in bipolar disorder.Psychiatry Clin Neurosci. 2003; Jun:57(3):243-50.

Illi A, Setälä-Soikkeli E, Viikki M, Poutanen O, Huhtala H, Mononen N, Lehtimäki T, Leinonen E, Kampman O: 5-HTR1A, 5-HTR2A, 5-HTR6, TPH1 and TPH2 polymorphisms and major depression. Neuroreport. 2009; 20:1125–28.

International Consortium on Lithium G, Amare AT, Schubert KO, Hou L, Clark SR, Papiol S, et al. Association of polygenic score for schizophrenia and HLA antigen and inflammation genes with response to lithium in bipolar affective disorder: a genome-wide association study. JAMA psychiatry. 2018;75(1):65–74.

Ising M, Horstmann S, Kloiber S, Lucae S, Binder EB, Kern N, Künzel HE, Pfennig A, Uhr M, Holsboer F. Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker? Biol Psychiatry. 2007; 62:47–54.

Ising M, Lucae S, Binder EB, Bettecken T, Uhr M, Ripke S, et al. A genome wide association study points to multiple loci that predict antidepressant drug treatment outcome in depression. Arch Gen Psychiatry. 2009; Sep:66(9):966-75.

Ivanov M, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Epigenomics and interindividual differences in drug response. Clin PharmacolTher. 2012; Dec:92(6):727-36.

Iwahashi K, Nishizawa D, Narita S, Numajiri M, Murayama O, Yoshihara E, Onozawa Y, Nagahori K, Fukamauchi F, Ikeda K, Ishigooka J. Haplotype analysis of GSK-3beta gene polymorphisms in bipolar disorder lithium responders and nonresponders. Clin Neuropharmacol. 2014;37(4):108–10.

Jackson JG, Diaz FJ, Lopez L, Leon J. A combined analysis of worldwide studies demonstrates an association between bipolar disorder and tobacco smoking behaviors in adults. Bipolar Disord. 2015; Sep;17(6):575-97.

Jakovcevski M, Bharadwaj R, Straubhaar J, Gao G, Gavin DP, Jakovcevski I, Mitchell AC, Akbarian S. Prefrontal cortical dysfunction after overexpression of histone deacetylase 1. Biol Psychiatry. 2013;74(9):696–705.

Jia YF, Choi Y, Ayers-Ringler JR, Biernacka JM, Geske JR, Lindberg DR, et al. Differential SLC1A2 Promoter Methylation in Bipolar Disorder With or Without Addiction.Front Cell Neurosci. 2017; Jul 21; 11:217.

Jian-Ping Zhang, MD, PhD and Anil K. Malhotra, MD. Pharmacogenetics of antipsychotics: recent progress and methodological issues. Expert Opin Drug MetabToxicol. 2013; February:9(2):183–91.

Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nature Reviews Genetics. 2007; 8:253-62.

Juckel G, Mavrogiorgou P, Bredemeier S, Gallinat J, Frodl T, Schulz C, Möller HJ, Hegerl U. Loudness dependence of primary auditory-cortex-evoked activity as predictor of therapeutic outcome to prophylactic lithium treatment in affective disorders--a retrospective study.Pharmacopsychiatry. 2004; Mar;37(2):46-51.

Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon D. et al. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. Arch Gen Psychiatry. 2002;59(6):530–7.

Karanti A, Kardell M, Lundberg U, Landén M. Changes in mood stabilizer prescription patterns in bipolar disorder. J Affect Disord. 2016 May; 195:50-6.

Kasri NN, Holmes AM, Bultynck G, Parys JB, Bootman MD, Rietdorf K, et al. Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca2 + -binding proteins.EMBO J. 2004;Jan28;23(2):312-21.

Keller MB, Lavori PW, Coryell W, Endicott J, Mueller TI. Bipolar I: a five-year prospective follow-up. J Nerv Ment Dis. 1993 Apr;181(4):238-45.

Kessing LV, Hellmund G, Andersen PK. Predictors of excellent response to lithium: results from a nationwide register-based study. Int Clin Psychopharmacol. 2011 Nov; 26(6):323-8.

Kessing LV, Vradi E, Andersen PK. Nationwide and population-based prescription patterns in bipolar disorder.Bipolar Disord. 2016 Mar; 18(2):174-82.

Kessing LV, Gerds TA, Knudsen NN, Jørgensen LF, Kristiansen SM, Voutchkova D, et al. Lithium in drinking water and the incidence of bipolar disorder: A nation-wide population-based study. Bipolar Disord. 2017 Nov;19(7):563-567.

Kessing LV, Bauer M, Nolen WA, Severus E, Goodwin GM, Geddes J. Effectiveness of maintenance therapy of lithium vs other mood stabilizers in monotherapy and in combinations: a systematic review of evidence from observational studies. Bipolar Disord. 2018; Feb 14.

Ketter TA, Miller S, Dell'Osso B, Wang PW. Treatment of bipolar disorder: Review of evidence regarding quetiapine and lithium. J Affect Disord. 2016 Feb; 191:256-73.

Kibirige D, Luzinda K, Ssekitoleko R. Spectrum of lithium induced thyroid abnormalities: a current perspective. Gitlin M. International Journal of Bipolar Disorders. 2016; Dec; 17:4:27. Thyroid Res. 2013 Feb 7; 6(1):3.

Kilts CD. The ups and downs of oral lithium dosing.J Clin Psychiatry. 1998;59Suppl 6:21-6;discussion27.

Kinon BJ, Chen L, Ascher-Svanum H, Stauffer VL, Kollack-Walker S, Sniadecki JL, Kane JM. Predicting response to atypical antipsychotics based on early response in the treatment of schizophrenia. Schizophrenia Research. 2008; 102:230–40.

Kinon BJ, Chen L, Ascher-Svanum H, Stauffer VL, Kollack-Walker S, Zhou W, Kapur S, Kane JM. Early response to antipsychotic drug therapy as a clinical marker of subsequent response in the treatment of schizophrenia. Neuropsychopharmacology. 2010; 35:581–90.

Kleindienst N, Engel R, Greil W. Which clinical factors predict response to prophylactic lithium? A systematic review for bipolar disorders. Bipolar Disord. 2005 Oct;7(5):404-17

Klengel T, Pape J, Binder EB, Mehta D. The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders. Neuropharmacology. 2014; 80:115-32.

Komoroski RA, Lindquist DM, Pearce JM. Lithium compartmentation in brain by 7Li MRS: effect of total lithium concentration. NMR Biomed. 2013;

Sep:26(9):1152-7.

Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. Cell Mol Neurobiol. 2018 Apr;38(3):579-593.

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. Clin Epigenetics. 2012;4(1):1.

Lagerberg TV, Aminoff SR, Aas M, Bjella T, Henry C, Leboyer M, et al. Alcohol use disorders are associated with increased affective lability in bipolar disorder. Journal of Affective Disorders. 2017; 208:316-24.

Lähteenvuo M, Tanskanen A, Taipale H, Hoti F, Vattulainen P, Vieta E, Tiihonen J. Real-world Effectiveness of Pharmacologic Treatments for the Prevention of Rehospitalization in a Finnish Nationwide Cohort of Patients With Bipolar Disorder. JAMA Psychiatry. 2018; Apr 1;75(4):347-355

Layden BT, Minadeo N, Suhy J, Abukhdeir AM, Metreger T, Foley K, Borge G, Crayton JW, Bryant FB, de Freitas DM. Biochemical and psychiatric predictors of Li(+) response and toxicity in Li(+)-treated bipolar patients. Bipolar Disord. 2004; Feb:6(1):53-61.

Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. Neuropharmacology. 2014; Jan; 76:639-56.

Lee HY, Kim YK. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism affects therapeutic response to mood stabilizer in symptomatic manic patients. Psychiatry Res. 2010;175(1–2):63–6.

Lee JH, Adler C, Norris M, Chu WJ, Fugate EM, Strakowski SM, Komoroski RA.4-T 7Li 3D MR spectroscopy imaging in the brains of bipolar disorder subjects. Magn Reson Med. 2012; 68:363–8. doi:10.1002/mrm.24361.

Lee RS, Pirooznia M, Guintivano J, Ly M, Ewald ER, Tamashiro KL, Gould TD, Moran TH, Potash JB. Search for common targets of lithium and valproic acid identifies novel epigenetic effects of lithium on the rat leptin receptor gene. Transl Psychiatry. 2015; Jul 14; 5:600.

Lee SH, Wray NR, Goddard ME, Visscher PM. Estimating Missing Heritability for Disease from Genome-wide Association Studies. Am J Hum Genet. 2011; Mar11;88(3): 294-305.

Leite RTP, Nogueira SO ,Nascimento JPR , Lima LS, Nóbrega TB, Virgínio MS, et al. The Use of Cannabis as a Predictor of Early Onset of Bipolar Disorder and Suicide Attempts. Neural Plast. 2015; 2015: 434127. Published online 2015 May 13.

Lett TA, Wallace TJ, Chowdhury NI, Tiwari AK, Kennedy JL, Müller DJ. Pharmacogenetics of antipsychotic-induced weight gain: review and clinical implications. Mol Psychiatry. 2012; Mar:17(3):242–66.

Leucht S, Hierl S, Kissling W, Dold M, Davis JM. Putting the efficacy of psychiatric and general medicine medication into perspective: review of meta-analyses. The British Journal of Psychiatry. 2012; 200:97–106.

Leuchter AF, Cook IA, Gilmer WS, Marangell LB, Burgoyne KS, Howland RH, et al. Effectiveness of a quantitative electroencephalographic biomarker for predicting differential response or remission with escitalopram and bupropion in major depressive disorder. Psychiatry Res. 2009; 169:124-31.

Levin GM, Bowles TM, Ehret MJ, Langaee T, Tan JY, Johnson JA, Millard WJ. Assessment of human serotonin 1A receptor polymorphisms and SSRI responsiveness. Mol Diagn Ther. 2007; 11:155–60.

Levin JB, Krivenko A, Howland M, Schlachet R, Sajatovic M. Medication adherence in patients with bipolar sisorder: a comprehensive. Review CNS Drugs. 2016; 30:819–35.

Lewitzka U, Severus E, Bauer R, Ritter P, Müller-Oerlinghausen B, Bauer M. The suicide prevention effect of lithium: more than 20 years of evidence-a narrative review. Int J Bipolar Disord. 2015; Dec;3(1):32.

Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, et al. Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. New England Journal of Medicine. 2005; 353:1209–23.

Lima IM, Barros A, Rosa DV, Albuquerque M, Malloy-Diniz L, Neves FS, Romano-Silva MA, de Miranda DM. Analysis of telomere attrition in bipolar disorder. J Affect Disord. 2015 Feb 1; 172:43-7.

Lin YF, Huang MC, Liu HC. Glycogen synthase kinase 3beta gene polymorphisms may be associated with bipolar I disorder and the therapeutic response to lithium. J Affect Disord. 2013;147(1–3):401–6.

Lindström L, Lindström E, Nilsson M, Höistad M. Maintenance therapy with second generation antipsychotics for bipolar disorder - A systematic review and meta-analysis. J Affect Disord. 2017 Apr 15; 213:138-150.

Loch AA, Zanetti MV, de Sousa RT, Chaim TM, Serpa MH, Gattaz WF, Teixeira AL, Machado-Vieira R. Elevated neurotrophin-3 and neurotrophin 4/5 levels in unmedicated bipolar depression and the effects of lithium. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2015 Jan 2; 56:243-6.

López-Jaramillo C, Lopera-Vásquez J, Gallo A, Ospina-Duque J, Bell V, Torrent C, Martínez-Arán A, Vieta E. Effects of recurrence on the cognitive performance of patients with bipolar I disorder: implications for relapse prevention and treatment adherence. Bipolar Disord. 2010;12(5):557–67.

López-Jaramillo C, Vargas C, Díaz-Zuluaga AM, Palacio JD, Castrillón G, Bearden C, Vieta E. Increased hippocampal, thalamus and amygdala volume in long-term lithium-treated bipolar I disorder patients compared with unmedicated patients and healthy subjects.Bipolar Disord. 2017; Feb:19(1):41-49.

Lovelace MD, Varney B, Sundaram G, Lennon MJ, Lim CK, Jacobs K, Guillemin GJ, Brew BJ. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases.Neuropharmacology. 2017; Jan;112(Pt B):373-88.
Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. Exp Cell Res. 2013; 319:133–41.

Luca A,Calandra C,Luca M. Gsk3 signalling and redox status in bipolar disorder: evidence from lithium efficacy. Oxid Med Cell Longev. 2016; 2016:3030547.

Ludwig B, Dwivedi Y.Dissecting bipolar disorder complexity through epigenomic approach.Mol Psychiatry. 2016; Nov;21(11):1490-1498.

Lutz PE, Mechawar N, Turecki G. Neuropathology of suicide: recent findings and future directions. Mol Psychiatry. 2017 Oct;22(10):1395-1412.

MacQueen GM. Magnetic resonance imaging and prediction of outcome in patients with major depressive disorder. Can J Psychiatry. 2009; 34:343–9.

Magalhães PV, Dodd S, Nierenberg AA, Berk M. Cumulative morbidity and prognostic staging of illness in the Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder (STEP-BD). Aust N Z J Psychiatry 2012; 46:1058:67.

Maj M, Pirozzi R, Magliano L, Bartoli L. Long-term outcome of lithium prophylaxis in bipolar disorder: a 5-year prospective study of 402 patients at a lithium clinic.

Am J Psychiatry. 1998; Jan:155(1):30-5.

Mamdani F, Alda M, Grof P, Young LT, Rouleau G, Turecki G. Lithium response and genetic variation in the CREB family of genes. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008; Jun5;147B(4):500-4.

Manchia M, Adli M, Akula N, Ardau R, Aubry JM, Backlund L, et al. Assessment of Response to Lithium Maintenance Treatment in Bipolar Disorder: A Consortium on Lithium Genetics (ConLiGen) Report. PLOS ONE. 2013; 8:Issue 6:e65636.

Manchia M, Maina G, Carpiniello B, Pinna F, Steardo L, D'Ambrosio V, Salvi V, Alda M, Tortorella A, Albert U. Clinical correlates of age at onset distribution in bipolar disorder: a comparison between diagnostic subgroups. Int J Bipolar Disord. 2017; 5:28.

Mancinelli R, Carpino G, Petrungaro S, Mammola CL, Tomaipitinca L, Filippini A, Facchiano A, Ziparo E, Giampietri C. Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases. Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017:4629495.

Marshall TM. Lithium as a nutrient. J Am Physicians Surgeons. 2015; Winter:20(4):104-9.

Martinsson L, Wei Y, Xu D, Melas PA, Mathé AA, Schalling M, Lavebratt C, Backlund L. Long-term lithium treatment in bipolar disorder is associated with longer leukocyte telomeres. Transl Psychiatry. 2013; 3:e261.

Mata I, Madoz V, Arranz MJ, Sham P, Murray RM. Olanzapine: concordant response in monozygotic twins with schizophrenia. Br J Psychiatry. 2001;178(1):86.

Marneros A. Origin and development of concepts of bipolar mixed states. J Affect Disord. 2001 Dec;67(1-3):229-40.

Massot O, Rousselle JC, Fillion MP, Januel D, Plantefol M, Fillion G. 5-HT1B receptors: a novel target for lithium. Possible involvement in mood disorders. Neuropsychopharmacology. 1999 Oct;21(4):530-41.

Masui T, Hashimoto R, Kusumi I, Suzuki K, Tanaka T, Nakagawa S, Kunugi H, Koyama T. A possible association between the −116C/G single nucleotide polymorphism of the XBP1 gene and lithium prophylaxis in bipolar disorder. Int J Neuropsychopharmacol. 2006; 9:83-8.

Masui T, Hashimoto R, Kusumi I, Suzuki K, Tanaka T, Nakagawa S, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Kato T, Kunugi H, Koyama T. Lithium response and Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene in Japanese patients with bipolar disorder. Psychiatr Genet. 2006;16(2):49–50.

Mayberg HS. Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimized treatment. Br Med Bull. 2003; 65:193–207.

McCarthy MJ, Nievergelt CM, Shekhtman T, Kripke DF, Welsh DK, Kelsoe JR. Functional genetic variation in the Rev-Erbalpha pathway and lithium response in the treatment of bipolar disorder. Genes Brain Behav. 2011;10(8):852–61.

McGrath CL, Kelley ME, Holtzheimer PE, Dunlop BW, Craighead WE, Franco AR, Craddock RC, Mayberg HS. Toward a neuroimaging treatment selection biomarker for major depressive disorder. JAMA Psychiatry. 2013;1–9.

Michelon L, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Miguita K, Breen G, Collier D, Vallada H. Association study of the INPP1, 5HTT, BDNF, AP-2beta and GSK-3beta GENE variants and restrospectively scored response to lithium prophylaxis in bipolar disorder. Neurosci Lett. 2006;403(3):288-93.

Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, et al. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. Am J Hum Genet. 2008; Mar;82(3):696-711.

Miller S, Suppes T, Mintz J, Hellemann G, Frye MA, McElroy SL, et al. Mixed Depression in Bipolar Disorder: Prevalence Rate and Clinical Correlates During Naturalistic Follow-Up in the Stanley Bipolar Network. Am J Psychiatry.2016;Oct1;173(10):1015-23.

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

Miwa S, Saretzki G. Telomerase and mTOR in the brain: the mitochondria connection. Neural Regen Res. 2017 Mar; 12(3): 358–361.

Miranda A, Shekhtman T, McCarthy M, DeModena A, Leckband SG, Kelsoe JR. Study of 45 candidate genes suggests CACNG2 may be associated with lithium response in bipolar disorder. J Affect Disord. 2019; Apr1:248:175-9.

Mirzakhanian H, Singh F, Cadenhead KS. Biomarkers in psychosis: an approach to early identification and individualized treatment. Biomark Med. 2014; Jan:8(1):51-7.

Mitjans M, Arias B, Jiménez E, Goikolea JM, Sáiz PA, García-Portilla MP, et al. Exploring genetic variability at PI, GSK3, HPA, and glutamatergic pathways in lithium response: association with IMPA2, INPP1, and GSK3B genes. J Clin Psychopharmacol. 2015;35(5):600–4.

Miura T, Noma H, Furukawa TA, Mitsuyasu H, Tanaka S, Stockton S, et al. Comparative efficacy and tolerability of pharmacological treatments in the maintenance treatment of bipolar disorder: a systematic review and network meta-analysis.Lancet Psychiatry. 2014;Oct;1(5):351-9.

Montalvo-Ortiz JL, Keegan J, Gallardo C, Gerst N, Tetsuka K, Tucker C, Matsumoto M, Fang D, Csernansky JG, Dong H. HDAC inhibitors restore the capacity of aged mice to respond to haloperidol through modulation of histone acetylation. Neuropsychopharmacology. 2014;39(6):1469-78.

Moore GJ, Cortese BM, Glitz DA, Zajac-Benitez C, Quiroz JA, Uhde TW, Drevets WC, Manji HK. A longitudinal study of the effects of lithium treatment on prefrontal and subgenual prefrontal gray matter volume in treatment-responsive bipolar disorder patients.J Clin Psychiatry. 2009; Apr 21;70(5):699-705.

Moskalev EA, Zavgorodnij MG, Majorova SP, Vorobjev IA, Jandaghi P, Bure IV, Hoheisel JD. Correction of PCR-bias in quantitative DNA methylation studies by means of cubic polynomial regression. Nucleic Acids Res. 2011;39(11):e77.

Motsinger AA, Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene - gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. Hum Genomics. 2006; 2(5): 318–328.

Mota de Freitas D, Castro MM, Geraldes CF. Is competition between Li+ and Mg2+ the underlying theme in the proposed mechanisms for the pharmacological action of lithium salts in bipolar disorder? Acc Chem Res. 2006 Apr;39(4):283-91.

Motoi Y, Shimada K, Ishiguro K, Hattori N. Lithium and autophagy. ACS Chem Neurosci. 2014 Jun 18;5(6):434-42

Müller DJ, Schulze TG, Knapp M, Held T, Krauss H, Weber T, et al. Familial occurrence of tardive dyskinesia. Acta Psychiatr Scand. 2001;104(5):375–79.

National Collaborating Centre for Mental Health (UK). Bipolar Disorder: The NICE Guideline on the Assessment and Management of Bipolar Disorder in Adults, Children and Young People in Primary and Secondary Care. Leicester (UK): British Psychological Society; 2018 Apr.

Nahorski SR. Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis. Trends Neurosci. 1988 Oct;11(10):444-8.

Nassar A, Azab AN. Effects of lithium on inflammation. ACS Chem Neurosci. 2014; Jun18:5(6):451–8.

Nettle D, Seeker L, Nussey D, Froy H, Bateson M. Consequences of measurement error in qPCR telomere data: A simulation study. PLoS One. 2019 May 1;14(5):e0216118.

Nierenberg AA, Husain MM, Trivedi MH, Fava M, Warden D, Wisniewski SR, Miyahara S, Rush AJ. Residual symptoms after remission of major depressive disorder with citalopram and risk of relapse: a STAR*D report. Psychol Med. 2010; 40:41–50.

Niitsu T1, Fabbri C, Bentini F, Serretti A. Pharmacogenetics in major depression: a comprehensive meta-analysis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013; Aug1:45:183-94.

Nikolova VL, Pattanaseri K, Hidalgo-Mazzei D, Taylor D, Young AH. Is lithium monitoring NICE? Lithium monitoring in a UK secondary care setting. J Psychopharmacol. 2018; Apr;32(4):408-415.

Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases.Int J Mol Sci. 2018;Nov19:19(11).pii:E3650.

Oh DH, Oh D, Son H, Webster MJ, Weickert CS, Kim SH. An association between the reduced levels of SLC1A2 and GAD1 in the dorsolateral prefrontal cortex in major depressive disorder: possible involvement of an attenuated RAF/MEK/ERK signaling pathway. J Neural Transm (Vienna). 2014 Jul;121(7):783-92.

Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K1, Kataoka T, et al. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. J Psychiatr Res. 2014;Jun:53:47-53.

Oquendo MA, Currier D, Liu SM, Hasin DS, Grant BF, Blanco C. Increased risk for suicidal behavior in comorbid bipolar disorder and alcohol use disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). J Clin Psychiatry. 2010 Jul;71(7):902-9.

Ott M,Stegmayr B,Renberg ES,Werneke U. Lithium intoxication: incidence, clinical course and renal function – a population-based retrospective cohort study. J Psychopharmacol. 2016; Oct:30(10):1008–19.

Oved K, Morag A, Pasmanik-Chor M, Oron-Karni V, Shomron N, Rehavi M, Stingl JC, Gurwitz D.Genome-wide miRNA expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies tentative SSRI antidepressant response biomarkers. Pharmacogenomics. 2012;13(10):1129–39.

Pacchiarotti I, Mazzarini L, Colom F, Sanchez-Moreno J, Girardi P, Kotzalidis GD, Vieta E. Treatment-resistant bipolar depression: towards a new definition. Acta Psychiatr Scand. 2009; Dec:120(6):429-40.

Padilha PDM, Toledo CEM, Rosada CTM. Análise da dispensação de medicamentos psicotrópicos pela rede pública municipal de saúde de campo mourão/PR. Revista UNINGÁ Review. 2014; 20:2:06-14.

Palmos AB, Breen G, Goodwin L, Frissa S, Hatch SL, Hotopf M, Thuret S, Lewis CM, Powell TR. Genetic risk for psychiatric disorders and telomere length. Front Genet. 2018; 9:468.

Pardo M, Abrial E, Jope RS, Beurel E. GSK3β isoform-selective regulation of depression, memory and hippocampal cell proliferation. Genes Brain Behav. 2016; Mar:15(3):348-55.

Pardo R, Andreolotti AG, Ramos B, Picatoste F, Claro E. Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. Journal of neurochemistry. 2003; 87:417-26.

Park YM, Lee SH. Clinical Usefulness of Loudness Dependence of Auditory Evoked Potentials (LDAEP) in Patients with Bipolar Disorder. Psychiatry Investig. 2013; Sep;10(3):233-7.

Patel P, Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? Curr Top Dev Biol. 2017;123:277-302.

Pérez MJ, Jara C, Quintanilla RA. Contribution of tau pathology to mitochondrial

impairment in neurodegeneration. Front Neurosci. 2018; 12:441.

Perlis RH, Ostacher MJ, Miklowitz DJ, Hay A, Nierenberg AA, Thase ME, Sachs GS. Clinical features associated with poor pharmacologic adherence in bipolar disorder: results from the STEPBD study. J Clin Psychiatry. 2010;71(3):296–303.

Perlis RH, Ostacher MJ, Patel JK, Marangell LB, Zhang H, Wisniewski SR, et al. Predictors of recurrence in bipolar disorder: primary outcomes from the systematic treatment enhancement program for bipolar disorder (STEP-BD). Am J Psychiatry. 2006;163(2):217-24.

Perlis RH, Smoller JW, Ferreira MA, McQuillin A, Bass N, Lawrence J, et al. A genome wide association study of response to lithium for prevention of recurrence in bipolar disorder. Am J Psychiatry. 2009; 166:718-25.

Perlis RH, Ostacher MJ, Miklowitz DJ, Hay A, Nierenberg AA, Thase ME, Sachs GS. Clinical features associated with poor pharmacologic adherence in bipolar disorder: results from the STEP-BD study. J Clin Psychiatry. 2010 Mar;71(3):296-303.

Perlis RH. Translating biomarkers to clinical practice Mol Psychiatry. 2011; 16:1076-87.

Perroud N, Zewdie S, Stenz L, Adouan W, Bavamian S, Prada P, et al. Methylation of serotonin receptor 3A in ADHD, borderline personality, and bipolar disorders: link with severity of the disorders and childhood maltreatment. Depression and anxiety. 2016; 33:45–55.

Perugi G, Akiskal HS, Micheli C, Musetti L, Paiano A, Quilici C, Rossi L, Cassano GB. Clinical subtypes of bipolar mixed states: validating a broader European definition in 143 cases. J Affect Disord. 1997 May;43(3):169-80.

Pfeiffer RM, Gail MH. Sample size calculations for population- and family-based case-control association studies on marker genotypes. Genet Epidemiol. 2003 Sep;25(2):136-48.

Pfennig A, Schlattmann P, Alda M, Grof P, Glenn T, Müller-Oerlinghausen B, et al. Influence of atypical features on the quality of prophylactic effectiveness of long-term lithium treatment in bipolar disorders. Bipolar Disord. 2010;12(4):390–396.

Popovic D, Torrent C, Goikolea JM, Cruz N, Sánchez-Moreno J, González-Pinto A, Vieta E. Clinical implications of predominant polarity and the polarity index in bipolar disorder: a naturalistic study. Acta Psychiatr Scand. 2014

May;129(5):366-74.

Porcelli S, Fabbri C, Drago A, et al. Genetics and antidepressants: where we are. Clin Neuropsychiatry. 2011; 7:99–150.

Porcelli S, Fabbri C, Serretti A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5- HTTLPR) association with antidepressant efficacy. Eur Neuropsychopharmacol. 2012; Apr:22(4):239-58.

Post RM, Denicoff KD, Leverich GS, Altshuler LL, Frye MA, Suppes TM, et al. Morbidity in 258 bipolar outpatients followed for 1 year with daily prospective ratings on the NIMH life chart method. J Clin Psychiatry. 2003;64(6):680–90.

Post RM. Preventing the Malignant Transformation of Bipolar Disorder. JAMA. 2018 Mar 27;319(12):1197-1198

Powell TR, Dima D, Frangou S, Breen G. Telomere length and bipolar disorder. Neuropsychopharmacology. 2018; 43:454.

Powell TR, Smith RG, Hackinger S, Schalkwyk LC, Uher R, McGuffin P, Mill J, Tansey KE. DNA methylation in interleukin-11 predicts clinical response to antidepressants in GENDEP. Transl Psychiatry. 2013; Sep 3: 3:e300.

Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. Bioinformatics. 2003;19(1):149-50.

Rai A, Shinde P, Jalan S. Network spectra for drug-target identification in complex diseases: new guns against old foes. Applied Network Science. 2018; 3:51.

Ramos P, Santos A, Pinto E, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A. Alkali metals levels in the human brain tissue: Anatomical region differences and age-related changes. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2016;38: Dec:174-82.

Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. Transl Psychiatry. 2012; Jul 3; 2:132.

Rao JS, Lee HJ, Rapoport SI, Bazinet RP. Mode of action of mood stabilizers: is the arachidonic acid cascade a common target? Mol Psychiatry. 2008; Jun:13(6):585-96.

Rej S, Herrmann N, Shulman K, Fischer HD, Fung K, Gruneir A. Current psychotropic medication prescribing patterns in late-life bipolar disorder.Int J Geriatr Psychiatry. 2017; Dec;32(12):1459-1465.

Renton JP, Xu N, Clark JJ, Hansen MR. Interaction of neurotrophin signaling with Bcl-2 localized to the mitochondria and endoplasmic reticulum on spiral ganglion neuron survival and neurite growth. J Neurosci Res. 2010 Aug 1;88(10):2239-51.

Rey R, Chauvet-Gelinier JC, Suaud-Chagny MF, Ragot S, Bonin B, d'Amato T, Teyssier JR. Distinct Expression Pattern of Epigenetic Machinery Genes in Blood Leucocytes and Brain Cortex of Depressive Patients. Mol Neurobiol. 2018 Oct 30.

Rizzo LB, Do Prado CH, Grassi-Oliveira R, Wieck A, Correa BL, Teixeira AL, Bauer ME. Immunosenescence is associated with human cytomegalovirus and shortened telomeres in type I bipolar disorder. Bipolar Disord. 2013 Dec;15(8):832-8

Roda Â, Chendo I, Kunz M. Biomarkers and staging of bipolar disorder: a systematic review. Trends Psychiatry Psychother. 2015;37(1),03–11.
Rowland TA,Marwaha S. Epidemiology and risk factors for bipolar disorder.Ther Adv Psychopharmacol. 2018; Sep; 8(9):251-69.

Rubinow DR, Moore M. Sex-dependent modulation of treatment response. Dialogues Clin Neurosci. 2004; 6:39-51.

Rybakowski JK, Amsterdam JD, Dyson WL, Frazer A, Winokur A, Kurtz J. Factors contributing to erythrocyte lithium-sodium countertransport activity in lithium-treated bipolar patients. Pharmacopsychiatry. 1989; Jan:22(1):16-20.

Rybakowski JK, Chlopocka-Wozniak M, Suwalska A. The prophylactic effect of long-term lithium administration in bipolar patients entering treatment in the 1970s and 1980s. Bipolar Disord. 2001;3(2):63–7.

Rybakowski JK, Dembinska D, Kliwicki S, Akiskal KK, Akiskal HH. TEMPS-A and long-term lithium response: positive correlation with hyperthymic temperament. J Affect Disord. 2013;145(2):187-9.

Rybakowski JK, Dembinska D, Kliwicki S, Akiskal KK, Akiskal HH. TEMPS-A and long-term lithium response: positive correlation with hyperthymic temperament. Journal of Affective Disorders. 2013; 145:187-9.

Rybakowski JK, Suwalska A, Czerski PM, Dmitrzak-Weglarz M, Leszczynska-Rodziewicz A, Hauser J. Prophylactic effect of lithium in bipolar affective illness may be related to serotonin transporter genotype. Pharmacol Rep. 2005; 57:124-7.

Rybakowski JK, Suwalska A, Skibinska M, Dmitrzak-Weglarz M, Leszczynska-Rodziewicz A, Hauser J. Response to lithium prophylaxis: interaction between serotonin transporter and BDNF genes. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007; 144:820-3.

Rybakowski JK, Suwalska A, Skibinska M, Szczepankiewicz A, Leszczynska-Rodziewicz A, Permoda A, Czerski PM, Hauser J. Prophylactic lithium response and polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene. Pharmacopsychiatry. 2005; 38:166-70.

Rybakowski JK. Factors associated with lithium efficacy in bipolar disorder. Harv Rev Psychiatry. 2014; 22(6):353-7.

Rybakowski JK. Genetic influences on response to mood stabilizers in bipolar disorder: current status of knowledge. CNS Drugs. 2013;27(3):165-73.

Rybakowski JK. Response to lithium in bipolar disorder: clinical and genetic findings.ACS ChemNeurosci. 2014; Jun 18;5(6):413-21.

Rybakowski JK. Challenging the Negative Perception of Lithium and Optimizing Its Long-Term Administration. Front Mol Neurosci. 2018 Oct 2; 11:349.

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. Nat Rev Drug Discov. 2008 May;7(5):426-37

Sachs GS, Peters AT, Sylvia L, Grunze H. Polypharmacy and bipolar disorder: what's personality got to do with it? Int J Neuropsychopharmacol. 2014 Jul;17(7):1053-61.

Sajatovic M, Strejilevich SA, Gildengers AG, Dols A, Al Jurdi RK, Forester BP, et al. A report on older-age bipolar disorder from the International Society for Bipolar Disorders Task Force. Bipolar Disord. 2015; Nov;17(7):689-704.

Salloum NC, McCarthy MJ, Leckband SG, Kelsoe JR. Towards the clinical implementation of pharmacogenetics in bipolar disorder. BMC Medicine. 2014; 12:90.

Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. J Cell Biol. 2005; Sep26:170(7):1101-11.

Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell. 2017 Mar 9;168(6):960-976.

Schaffer A, Sinyor M, Reis C, Goldstein BI, Levitt AJ. Suicide in bipolar disorder: characteristics and subgroups. Bipolar Disord. 2014; Nov;16(7):732-40.

Schaffer A, Weinstock LM, Sinyor M, Reis C, Goldstein BI, Yatham LN, Levitt AJ. Self-poisoning suicide deaths in people with bipolar disorder: characterizing a subgroup and identifying treatment patterns. Int J Bipolar Disord. 2017; Dec;5(1):16.

Schennach-Wolff R, Jäger M, Seemüller F, Obermeier M, Messer T, Laux G, et al. Defining and predicting functional outcome in schizophrenia and schizophrenia spectrum disorders. Schizophr Res. 2009; Sep:113(2-3):210-7.

Scherag A, Müller HH, Dempfle A, Hebebrand J, Schäfer H. Data adaptive interim modification of sample sizes for candidate-gene association studies. Hum Hered. 2003;56(1-3):56-62.

Schratt G. Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. Curr Opin Neurobiol. 2009; 19:213-9.

Schulze TG, Alda M, Adli M, Akula N, Ardau R, Bui ET, 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(1):72-8.

Scott J, Pope M. Self-reported adherence to treatment with mood stabilizers, plasma levels, and psychiatric hospitalization. Am J Psychiatry. 2002;159(11):1927–9.

Serretti A, Lilli R, Lorenzi C, Gasperini M, Smeraldi E. Tryptophan hydroxylase gene and response to lithium prophylaxis in mood disorders. J Psychiatr Res. 1999; 33:371-7.

Severus E, Taylor MJ, Sauer C, Pfennig A, Ritter P, Bauer M, Geddes JR. Lithium for prevention of mood episodes in bipolar disorders: systematic review and meta-analysis. Int J Bipolar Disord. 2014 Dec 20; 2:15.

Shapero BG, Weiss RB, Burke TA, Boland EM, Abramson LY, Alloy LB.Kindling

of Life Stress in Bipolar Disorder: Effects of Early Adversity. BehavTher. 2017; May;48(3):322-334.

Shapiro HI, Davis KA. Hypercalcemia and "primary" hyperparathyroidism during lithium therapy. Am J Psychiatry. 2015; Jan:172(1):12-5.

Shim IH, Woo YS, Bahk WM. Prevalence rates and clinical implications of bipolar disorder "with mixed features" as defined by DSM-5. J Affect Disord. 2015; Mar 1; 173:120-5.

Shimabukuro M, Jinno Y, Fuke C, Okazaki Y. Haloperidol treatment induces tissue- and sex-specific changes in DNA methylation: a control study using rats. Behav Brain Funct. 2006; 2:37.

Shulman KI, Hermann N. The nature and management of mania in old age. Psychiatr. Clin. North Am. 1999; 22(3):649-65.

Silva LF, Loureiro JC, Franco SCR, Santos MdL, Secolin R, Lopes-Cendes I, et al. Assessing treatment response to prophylactic lithium use in patients with bipolar disorder. Jornal Brasileiro de Psiquiatria. 2016; 65:9–16.

Silva LFA, Loureiro JC, Franco SCR, Santos ML, Secolin R, Cendes IL, Dantas CR, Banzato CEM. Assessing treatment response to prophylactic lithium use in patients with bipolar disorder. J. bras. psiquiatr. 2016; 65:1

Smith AJ, Kim SH, Tan J, Sneed KB, Sanberg PR, Borlongan CV, Shytle RD. Plasma and Brain Pharmacokinetics of Previously Unexplored Lithium Salts.RSC Adv. 2014;4(24):12362-12365.

Smith FE,Thelwall PE,Necus J,Flowers CJ,Blamire AM,Cousins DA. 3D ^{7}Li magnetic resonance imaging of brain lithium distribution in bipolar disorder.Mol Psychiatry. 2018; 23(11): 2184–2191.

Smith KA, Cipriani A. Lithium and suicide in mood disorders: Updated meta-review of the scientific literature.Bipolar Disord. 2017; Nov;19(7):575-586.

Snider KH, Sullivan KA, Obrietan K. Circadian regulation of hippocampal-dependent memory: circuits, synapses, and molecular mechanisms.Neural Plast. 2018;Feb8:2018:7292540.

Soeiro-de-Souza MG, Teixeira AL, Mateo EC, Zanetti MV, Rodrigues FG, de Paula VJ, et al. Leukocyte telomerase activity and antidepressant efficacy in bipolar disorder.Eur Neuropsychopharmacol. 2014; Jul;24(7):1139-43.

Solntseva EI, Bukanova JV, Kondratenko RV, Skrebitsky VG. Lithium ions in nanomolar concentration modulate glycine-activated chloride current in rat hippocampal neurons.Neurochem Int. 2016;Mar:94:67-73.

Solomon DA, Leon AC, Coryell WH, Endicott J, Li C, Fiedorowicz JG, Boyken L, Keller MB. Longitudinal course of bipolar I disorder: duration of mood episodes. Arch Gen Psychiatry. 2010;Apr:67(4):339-47.

Song HR, Kwon YJ, Bahk WM, Woo YS, Lee HB, Lee J, Lee DB, Lee SY, Kim MD, Won S, Lee K, Sohn I, Lee JG, Shin YC, Chung S, Jang S, Jae YM, Yoon BH. Current prescription pattern of maintenance treatments for bipolar patients in Korea: A focus on the transition from acute treatments. Psychiatry Clin Neurosci. 2016; Jan;70(1):42-50.

Song HR, Kwon YJ, Bahk WM, Woo YS, Lee HB, Lee J, et al. Current prescription pattern of maintenance treatments for bipolar patients in Korea: A focus on the transition from acute treatments.Psychiatry Clin Neurosci. 2016; Jan;70(1):42-50.

Song J, Bergen SE, Di Florio A, Karlsson R, Charney A, Ruderfer DM, et al. Genome-wide association study identifies SESTD1 as a novel risk gene for lithium-responsive bipolar disorder. Mol Psychiatry. 2017;22(8):1223.

Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Peggie M, Hastie CJ, McLauchlan H, et al. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain.J Neurochem. 2010; Nov:115(4):974-83.

Spoorthy MS, Chakrabarti S, Grover S. Comorbidity of bipolar and anxiety disorders: An overview of trends in research.World J Psychiatry. 2019;Jan4;9(1):7-29.

Squassina A, Manchia M, Borg J, Congiu D, Costa M, Georgitsi M, et al. Evidence for association of an ACCN1 gene variant with response to lithium treatment in Sardinian patients with bipolar disorder. Pharmacogenomics. 2011; 12:1559-69.

Squassina A, Pisanu C, Congiu D, Caria P, Frau D, Niola P, et al. Leukocyte telomere length positively correlates with duration of lithium treatment in bipolar disorder patients. Eur Neuropsychopharmacol. 2016 Jul;26(7):1241-7.

Squassina A, Pisanu C, Corbett N, Alda M. Telomere length in bipolar disorder and lithium response. Eur Neuropsychopharmacol. 2017 Jun;27(6):560-567.

Squassina A, Pisanu C, Vanni R. Mood disorders, accelerated aging, and

Inflammation: is the link hidden in telomeres?. Cells. 2019; Jan15:8(1).

St Clair D, Xu M, Wang P, Yu Y, Fang Y, Zhang F, Zheng X, Gu N, Feng G, Sham P, He L. Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the chinese famine of 1959-1961. JAMA. 2005;294(5):557-62.

Steen VM, Lovlie R, Osher Y, Belmaker RH, Berle JO, Gulbrandsen AK. The polymorphic inositol polyphosphate 1phosphatase gene as a candidate for pharmacogenetic prediction of lithium-responsive manic-depressive illness. Pharmacogenetics. 1998; 8:259-68.

Stingl JC, Brockmöller J, Viviani R. Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. Mol Psychiatry. 2013; 18:273–87.

Strawbridge R, Young AH, Cleare AJ. Biomarkers for depression: recent insights, current challenges and future prospects. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2017; 13:1245–62.

Strawbridge RJ, Ward J, Ferguson A, Graham N ,Shaw RJ, Cullen B, et al. Identification of novel genome-wide associations for suicidality in UK Biobank, genetic correlation with psychiatric disorders and polygenic association with completed suicide. EBioMedicine. 2019; Mar; 41:517-25.

Swann AC, Koslow SH, Katz MM, Maas JW, Javaid J, Secunda SK, et al. Lithium carbonate treatment of mania. Cerebrospinal fluid and urinary monoamine metabolites and treatment outcome. Arch. Gen. Psychiatry. 1987;44(4):345–54.

Szczepankiewicz A, Rybakowski JK, Suwalska A, Hauser J. Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with lithium response in bipolar patients. Neuro Endocrinol Lett. 2011; 32:545-51.

Tang H, Dalton CF, Srisawat U, Zhang ZJ, Reynolds GP. Methylation at a transcription factor-binding site on the 5-HT1A receptor gene correlates with negative symptom treatment response in first episode schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol. 2014 ; Apr :17(4):645-9.

Tang J, Xiong Y, Zhou HH, Chen XP. DNA methylation and personalized medicine. J Clin Pharm Ther. 2014; Sep17.

Taveira, ACA. Atitude do psiquiatra brasileiro frente ao uso de lítio e outros estabilizadores do humor no transtorno bipolar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Tavoulari S, Margheritis E, Nagarajan A, Witt DC, Zhang YW, Rosado E, Ravera

S, Rhoades E, Forrest LR, Rudnick G. Two na sites control conformational changeina neurotransmitter transporter homolog. The journal of biological chemistry. 2016; 291:3:1456–71.

Teixeira AL, Salem H, Frey BN, Barbosa IG, Machado-Vieira R. 2016. Update on bipolar disorder biomarker candidates. Expert Rev. Mol. Diagn. 2016;16(11):1209–20.

Tharoor H, Kotambail A, Jain S, Sharma PS, Satyamoorthy K. Study of the association of serotonin transporter triallelic 5-HTTLPR and STin2 VNTR polymorphisms with lithium prophylaxis respons. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008; Jun5:147B(4):500–4.

Thomson D, Berk M, Dodd S, Rapado-Castro M, Quirk SE, Ellegaard PK, Berk L, Dean OM. Tobacco Use in Bipolar Disorder. Clin Psychopharmacol Neurosci. 2015; Apr; 13(1): 1–11. doi: 10.9758/cpn.2015.13.1.1

Tighe SK, Mahon PB, Potash JB. Predictors of Lithium Response in Bipolar Disorder. Ther Adv Chronic Dis. 2011; May; 2(3): 209–226.

Tondo L, Baldessarini RJ. Antisuicidal Effects in Mood Disorders: Are They Unique to Lithium? Pharmacopsychiatry. 2018; Sep;51(5):177-188.

Tondo L,Vázquez GH,Ross J. BaldessariniRJ. Depression and Mania in Bipolar Disorder. Curr Neuropharmacol. 2017; Apr; 15(3):353-58.

Tsui MMK, Tai WCS, Wong WY, Hsiao WLW. Selective G2/M arrest in a p53Val135-transformed cell line induced by lithium is mediated through an intricate network of MAPK and β-catenin signaling pathways. Life Sciences. 2012;91(9-10):312–21.

Tundo A, De Crescenzo F, Gori D, Cavalieri P. Long-term treatment responseto continuous cycling course in bipolar disorders: A meta-analysis.J Affect Disord. 2018;Dec1;241:367-70.

Turecki G, Grof P, Grof E, D'Souza V, Lebuis L, Marineau C, et al. Mapping susceptibility genes for bipolar disorder: a pharmacogenetic approach based on excellent response to lithium. Mol Psychiatry. 2001; 6:570-8.

Vadnie CA, McClung CA. Circadian Rhythm Disturbances in mood disorders: insights into the role of the suprachiasmatic nucleus. Neural Plast. 2017; 2017:1504507.

Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β- catenin. EMBO J. 2012; Jun13;31(12):2714-36.

Van Os J, Selten JP. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia: the may 1940 invasion of the netherlands. Br J Psychiatry. 1998; 172:324-6.

Vasconcelos-Moreno MP, Fries GR, Gubert C, Dos Santos BTMQ, Fijtman A, Sartori J, Ferrari P, et al.. Telomere length, oxidative stress, inflammation and BDNF levels in siblings of patients with bipolar disorder: implications for accelerated cellular aging. Int J Neuropsychopharmacol. 2017;Jun1:20(6):445-54.

Vázquez GH, Holtzman JN, Lolich M, Ketter TA, Baldessarini RJ. Recurrence rates in bipolar disorder: Systematic comparison of long-term prospective, naturalistic studies versus randomized controlled trials. Eur Neuropsychopharmacol. 2015; Oct;25(10):1501-12.

Vialou V, Feng J, Robison AJ, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of depression and antidepressants action. Annu Rev PharmacolToxicol. 2013; 53:59–87.

Vita A, Sacchettia LPE. Lithium in drinking water and suicide prevention: a review of the evidence. InternationalClinicalPsychopharmacology. 2015; 30:1–5.

Vojvoda D, Grimmell K, Sernyak M, Mazure CM. Monozygotic twins concordant for response to clozapine. Lancet. 1996;347(8993):61.

Voytovych H, Kriváneková L, Ziemann U.Lithium: a switch from LTD- to LTP-like plasticity in human cortex. Neuropharmacology. 2012; Aug;63(2):274-9.

Vries C, Bergen AV, Regeer EJ, Benthem E, Kupka RW, Boks MP. The effectiveness of restarted lithium treatment after discontinuation: reviewing the evidence for discontinuation- induced refractoriness. Bipolar Disord. 2013;15(6):645–9.

Wang X, Xie Y, Zhang T, Bo S, Bai X, Liu H, Li T, Liu S, Zhou Y, Cong X, Wang Z, Liu D. Resveratrol reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour: Involvement of BDNF level, ERK phosphorylation and expression of Bcl-2 and Bax in rats. Brain Res Bull. 2016 Jul; 125:134-43.

Wang XW, Luo Q, Tian FT, Cheng BC, Qiu LQ, Wang SW, He M, Wang HW, Duan MD, Jia ZJ. Brain grey-matter volume alteration in adult patients with bipolar disorder under different conditions: a voxel-based meta-analysis. J Psychiatry Neurosci. 2019; Mar:44(2):89–101.

Wang Y, Feigon J. Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. Curr Opin Struct Biol. 2017; Dec: 47:77-87.

Wang Z, Li Z, Chen J, Huang J, Yuan C, Hong W, Yu S, Fang Y. Association of BDNF gene polymorphism with bipolar disorders in Han Chinese population. Genes Brain Behav. 2012;11(5):524–8.

Warnault V, Darcq E, Levine A, Barak S, Ron D. Chromatin remodeling: a novel strategy to control excessive alcohol drinking. Transl Psychiatry. 2013; 3:e231.

Washizuka S, Ikeda A, Kato N, Kato T. Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. Int J Neuropsychopharmacol. 2003; 6:421-4.

Wehmeier PM, Gebhardt S, Schmidtke J, Remschmidt H, Hebebrand J, Theisen FM. Clozapine: weight gain in a pair of monozygotic twins concordant for schizophrenia and mild mental retardation. Psychiatry Res. 2005;133(2–3):273–6.

Wei YB, Backlund L, Wegener G, Mathe AA, Lavebratt C. Telomerase dysregulation in the hippocampus of a rat model of depression: normalization by lithium. Int J Neuropsychopharmacol. 2015;18:pyv002.

Weinsanto I, Mouheiche J, Laux-Biehlmann A, Aouad M, Maduna T,Petit-Demoulière N, Chavant V,Poisbeau P, Darbon P, Charlet A, Giersch A, Parat MO, Goumon Y. Lithium reverses mechanical allodynia through a mu opioid-dependent mechanism. Mol Pain. 2018; 14:1744806917754142.

Weisler RH, Nolen WA, Neijber A, Hellqvist A, Paulsson B. Continuation of quetiapine versus switching to placebo or lithium for maintenance treatment of bipolar I disorder (Trial 144: a randomized controlled study) J Clin Psychiatry. 2011;72(11):1452–1464.

White C, Stirling J, Hopkins R, Morris J, Montague L, Tantam D, Lewis S. Predictors of 10-year outcome of first-episode psychosis. Psychol Med. 2009; Sep:39(9):1447-56.

Wilkie MJV, Smith G, Day RK, Matthews K, Smith D, Blackwood D, Reid IC, Wolf CR. Polymorphisms in the SLC6A4 and HTR2A genes influence treatment outcome following antidepressant therapy. Pharmacogenomics J. 2009; 9:61–70.

Wu S, Zheng SD, Huang HL, Yan LC, Yin XF, Xu HN, Zhang KJ, Gui JH, Chu L, Liu XY. Lithium down-regulates histone deacetylase 1 (HDAC1) and induces degradation of mutant huntingtin.J Biol Chem. 2013;Dec 6;288(49):35500-10.

Xiao Y, Camarillo C, Ping Y, Arana TB, Zhao H, Thompson PM, Xu C, Su BB, Fan H, Ordonez J, Wang L, Mao C, Zhang Y, Cruz D, Escamilla MA, Li X, Xu C. The DNA methylome and transcriptome of different brain regions in schizophrenia and bipolar disorder. PloS one. 2014; 9:95875.

Xia Y, Wang CZ, Liu J, Anastasio NC, Johnson KM. Lithium protection of phencyclidine-induced neurotoxicity in developing brain: the role of PI-3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. J Pharmacol Exp Ther. 2008; Sep:326(3): 838–48.

Xiao Y, Camarillo C, Ping Y, Arana TB, Zhao H, Thompson PM, Xu C, Su BB, Fan H, Ordonez J, Wang L, Mao C, Zhang Y, Cruz D, Escamilla MA, Li X1, Xu C. The DNA methylome and transcriptome of different brain regions in schizophrenia and bipolar disorder. PLoS One. 2014; 9(4):e95875.

Yamagata AS, Brietzkeb E, Rosenblatc JD, Kakarc R, McIntyrec RS. Medical comorbidity in bipolar disorder: the link with metabolic-inflammatory systems. Journal of Affective Disorders. 2017; 211:99-106.

Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Bond DJ, Frey BN, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder. Bipolar Disord. 2018; Mar;20(2):97-

Yazici O, Kora K, Polat A, Saylan M. Controlled lithium discontinuation in bipolar patients with good response to long-term lithium prophylaxis. J Affect Disord. 2004; Jun:80(2-3):269-71.

Yoshikawa T, Honma S. Lithium lengthens circadian period of cultured brain slices in area specific manner. Behav Brain Res. 2016; Nov1:314:30-7.

Young AH, McElroy SL, Bauer M, Philips N, Chang W, Olausson B, Paulsson B, Brecher M; EMBOLDEN I (Trial 001) Investigators. A double-blind, placebo-controlled study of quetiapine and lithium monotherapy in adults in the acute phase of bipolar depression (EMBOLDEN I). J Clin Psychiatry. 2010; Feb;71(2):150-62.

Yu W, Greenberg ML. Inositol depletion, GSK3 inhibition and bipolar disorder. Future Neurol. 2016;May;11(2):135-48.

Yutzy SH, Woofter CR, Abbott CC, Melhem IM, Parish BS. The increasing frequency of mania and bipolar disorder: causes and potential negative impacts. J Nerv Ment Dis. 2012; May;200(5):380-7.

Zannas AS. Lithium treatment and mechanisms of aging. Molecular Psychiatry. 2018; 23:2112–3.

Zanni G, Michno W, Di Martino E, Tjärnlund-Wolf A, Pettersson J, Mason CE, Hellspong G, Blomgren K, Hanrieder J. Lithium accumulates in neurogenic brain regions as revealed by high resolution ion imaging. Sci Rep. 2017; 7:40726.

Zhao H, Alam A, San CY, Eguchi S, Chen Q, Lian Q, Ma D. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: recent developments.Brain Res. 2017 ;Jun15 :1665:1-21.

Zhang B, Guan F, Chen G, Lin H, Zhang T, Feng J, Li L, Fu D. Common variants in SLC1A2 and schizophrenia: Association and cognitive function in patients with schizophrenia and healthy individuals. Schizophr Res. 2015 Dec;169(1-3):128-134.

Zhao H, Xu J, Pang L, Zhang Y, Fan H, Liu L, Liu T, Yu F, Zhang G, Lan Y, Bai J, Li X, Xiao Y. Genome-wide DNA methylome reveals the dysfunction of intronic microRNAs in major psychosis. BMC medical genomics. 2015; 8:62.

Zhou Y, Zomot E, Kanner BI. Identification of a lithium interaction site in the gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter GAT-1. J Biol Chem. 2006 Aug 4;281(31):22092-9.