ELIZA HIROMI IKENAGA

Atividade da fosfolipase A₂ no transtorno bipolar

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

**São Paulo
2013**

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ikenaga, Eliza Hiromi

Atividade da fosfolipase A₂ no transtorno bipolar / Eliza Hiromi

Ikenaga. -- São Paulo, 2013.

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

Orientador: Wagner Farid Gattaz.

Descritores: 1.Transtorno bipolar 2.Fosfolipases A₂ 3.Plaquetas

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

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

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

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

Dedicatória

À minha mãe Fumiko Ikenaga e ao meu pai Tomoo Ikenaga (in memória), à minha irmã Marcia e ao meu irmão Carlos que foram fundamentais na minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro e oportunidade de realização deste projeto.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental e do Departamento e Instituto da Psiquiatria da FMUSP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) que me acolheram na realização do mestrado.

Agradeço especialmente ao meu orientador e chefe Professor Dr. Wagner Farid Gattaz, pela oportunidade, experiência, ensinamento e incentivo.

Ao Professor Ricardo Moreno do GRUDA (Grupo de Estudo de Doenças Afetivas) e ao seu grupo, principalmente ao Dr. Luis Felipe O. Costa, pela colaboração, possibilitando aumentar a quantidade de pacientes para este projeto.

Ao Professor Dr. Rodrigo Machado-Vieira e ao seu grupo, pela importante colaboração na inclusão de um novo grupo de pacientes com transtorno bipolar (TB) sem e pós-tratamento com lítio e controle para este projeto.

Aos pacientes com TB e também aos voluntários que foram controles, gostaria de agradecer pela possibilidade de realizar este estudo.

A todos os colegas do grupo do Laboratório de Neurociências do LIM-27 do Instituto da Psiquiatria do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela amizade e importante contribuição para realização deste projeto, especialmente à Leda L. Talib.

Ao Dr. Daniel S. Kerr e ao Dr. Rafael Sousa, pela cooperação e disponibilidade.

À Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo, pelo incentivo e apoio na fase inicial da realização deste projeto.

À minha amiga Aline Siqueira Ferreira, pela amizade, confiança, apoio, dedicação incondicional e por dividir os seus conhecimentos.

À minha amiga Luciana Costa Rodrigues pela agradável amizade e apoio.

Agradeço aos meus pais que sempre foram a minha base e meu porto seguro; e às minhas irmãs Marcia e Luciana pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transtorno bipolar	1
1.2 Quadro Clínico	1
1.3 Epidemiologia e hereditariedade	1
2. Revisão literária	2
2.1 Achados biológicos	2
2.2. Tratamento medicamentoso	3
2.3 Metabolismos de fosfolípides da membrana	6
2.4 Fosfolipase A ₂	10
2.4.1 PLA ₂ independente de cálcio – iPLA ₂	12
2.4.2 PLA ₂ secretória - sPLA ₂	13
2.4.3 PLA ₂ citosólica – cPLA ₂	13
2.4.4 Outras classes dos subtipos da PLA ₂	15
2.4.5 PLA ₂ como alvo terapêutico	16
2.5 Alterações da PLA ₂ em doenças neuropsiquiátricas	17
2.5.1 Esquizofrenia	17
2.5.2 Doença de Alzheimer	19
2.5.3 Epilepsia	20

2.5.4 Transtorno bipolar	21
2.6 O uso de plaquetas como um possível modelo periférico de neurônios	24
2.7 Princípios gerais para a determinação da atividade da PLA ₂	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos	28
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
4.1 Casuística	29
4.2 Coleta das amostras	30
4.3 Preparo da amostra	30
4.3.1 Lavagem das plaquetas.....	30
4.4 Determinações da atividade dos três subtipos de PLA ₂	31
4.4.1 Determinação da concentração da proteína plaquetária.....	31
4.4.2 Ensaio radioenzimático	33
4.5 Dosagem de lítio	35
4.6 Análises estatísticas.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Primeira amostra	36
5.1.1 Pacientes sem tratamento medicamentoso e grupo controle	36
5.1.2. Pacientes antes e após a administração de lítio por 6 semanas	38

5.1.3 Pacientes após a administração de lítio por seis semanas e o grupo controle	40
5.1.4 Correlações entre as variáveis quantitativas estudadas	42
5.1.5 Característica demográfica dos participantes	46
5.2 Segunda amostra	47
5.2.1 Pacientes medicados há pelo menos um ano e grupo controle	47
5.2.2 A influência da idade na atividade da PLA ₂ :	49
5.2.3 Pacientes sem tratamento, pacientes medicados há pelo menos um ano e grupo controle	50
5.2.4 Característica demográfica dos participantes	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	58
8 REFERÊNCIAS	59
Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido	1
Apêndice B – Aprovação do projeto de pesquisa CAPPesq	4
Apêndice C – Escala de Hamilton para avaliação de depressão (HAM-D)....	5
Apêndice D – Escala de Young para avaliação de mania.....	8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura esquemática da bicamada fosfolipídica.....	7
Figura 2: Estrutura molecular dos fosfolípides de membrana	8
Figura 3: Estrutura molecular dos dois fosfolípides de membrana mais comuns	8
Figura 4: Estrutura da membrana plasmática.	9
Figura 5: Atuação da fosfolipase A ₂ na membrana celular	11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correlação entre a atividade dos subtipos de PLA ₂ e a sintomatologia depressiva e maníaca dos pacientes	46
Tabela 2. Idade e sexo dos pacientes sem de tratamento medicamentoso e seu respectivo grupo controle	47
Tabela 3. Idade e sexo dos pacientes tratados há pelo menos um ano e seu respectivo grupo controle	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Atividade do subtipo iPLA ₂ nos pacientes sem tratamento medicamentoso e no grupo controle jovem ** p < 0,01.....	36
Gráfico 2. Atividade do subtipo sPLA ₂ nos pacientes sem tratamento medicamentoso e no grupo controle jovem ** p < 0,01.....	37
Gráfico 3. Atividade do subtipo cPLA ₂ nos pacientes sem tratamento medicamentoso e no grupo controle jovem *** p < 0,001	37
Gráfico 4. Atividade de iPLA ₂ nos pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por 6 semanas	38
Gráfico 5. Atividade de sPLA ₂ nos pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por 6 semanas p = 0,176	39
Gráfico 6. Atividade de cPLA ₂ nos pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por 6 semanas p = 0,374	39
Gráfico 7. Atividade de iPLA ₂ de pacientes após a administração de lítio por seis semanas e grupo controle * p < 0,05.....	40
Gráfico 8. Atividade de sPLA ₂ de pacientes após a administração de lítio por seis semanas e grupo controle ** p < 0,01	41
Gráfico 9. Atividade de cPLA ₂ de pacientes após a administração de lítio por seis semanas e grupo controle ** p < 0,01	41
Gráfico 10. Correlação entre a atividade de iPLA ₂ e a litemia dos pacientes com transtorno bipolar tipo II tratados com lítio durante seis semanas (r = -, 20; p = 0,401).....	42

Gráfico 11. Correlação entre a atividade de sPLA ₂ e a litemia dos pacientes com transtorno bipolar tipo II tratados com lítio durante seis semanas ($r = ,37$; $p = 0,104$).....	43
Gráfico 12. Correlação entre a atividade de cPLA ₂ e a litemia dos pacientes com transtorno bipolar tipo II tratados com lítio durante seis semanas ($r = ,29$; $p = 0,217$).....	43
Gráfico 13. Pontuações na escala de Hamilton para avaliação de depressão para os pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por seis semanas *** $p < 0,001$	45
Gráfico 14. Pontuações na escala de Young para avaliação da mania para os pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por seis semanas $p = 0,347$	45
Gráfico 15. Atividade de iPLA ₂ nos grupos de pacientes medicados há pelo menos um ano, diagnosticados com TB I ou TB II, e seu respectivo grupo controle $p = 0,989$	48
Gráfico 16. Atividade de sPLA ₂ nos grupos de pacientes medicados há pelo menos um ano, diagnosticados com TB I ou TB II, e seu respectivo grupo controle $p = 0,147$	48
Gráfico 17. Atividade de cPLA ₂ nos grupos de pacientes medicados há pelo menos um ano, diagnosticados com TB I ou TB II, e seu respectivo grupo controle $p = 0,846$	49
Gráfico 18. Correlação entre a idade e atividades de iPLA ₂ , sPLA ₂ e cPLA ₂	50

Gráfico 19: Redução da atividade de iPLA₂ em plaquetas de pacientes sem tratamento comparada a determinações em controles e pacientes medicados há pelo menos um ano *p < 0,05..... 51

Gráfico 20. Atividade de iPLA₂ entre grupo controle, grupo TB sem tratamento e grupo de pacientes medicados há pelo menos um ano com ausência de sintomas psicóticos (p = 0,02) 52

LISTA DE ABREVIATURAS

^{31}P -MRS	ressonância magnética de fósforo 31
AA	ácido araquidônico
ACD-NH	glicose; ácido cítrico; citrato de sódio di-hidratado
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
APP	proteína precursora do amiloide
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
COX	ciclooxigenase
cPLA ₂	fosfolipase A ₂ citosólica dependente de cálcio
CYP	citocromo P450 epoxigenase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DHA	ácido docosahexanoico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
GABA	ácido γ -aminobutírico
GSK-3B	glicogênio sintase quinase-3 beta
IC	intervalo de confiança
iPLA ₂	fosfolipase A ₂ intracelular independente de cálcio
Lp PLA ₂	fosfolipase A ₂ lisossomal
MAO	monoamino oxidase
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NMDA	N-metil-D-aspartato

PAF	fator de ativação de plaquetas
PAF-AH	fator de ativação de plaquetas - acetilhidrolase
PANSS	escala de avaliação das síndromes positiva e negativa
PIP ₂	fosfatidil inositol-4,5 - bifosfato
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
PG	prostaglandina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PKC	proteína quinase C
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLC	fosfolipase C
PO ₄ ³⁻	fosfato
PRP	plasma rico em plaquetas
SNC	sistema nervoso central
SOE	sem outra especificação
sPLA ₂	fosfolipase A ₂ extracelular dependente de cálcio
TB	transtorno bipolar
TDM	transtorno depressivo maior
TRH	tireotropina

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	cálcio
CPM	contagem por minuto
g	grama
gl	grau de liberdade
H	hidrogênio
kDa	quilodalton
L	litro
mg/ mL	miligrama por mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
mol/ L	mol por litro
Na^{+}	sódio
qsp	quantidade suficiente para
v/ v	volume por volume
μL	microlitro

LISTA DE SIGLAS

APA	Associação Psiquiátrica Americana
CID-10	Classificação Internacional de Doenças 10ª edição
DMS-IV-TR	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 4ª edição revisada
SCID	<i>Structured Clinical Interview for DSM-IV</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IPq	Instituto de Psiquiatria
LIM-27	Laboratório de Investigação Médica 27/ Laboratório de Neurociências
OMS	Organização Mundial da Saúde

RESUMO

Ikenaga, EH. Atividade da fosfolipase A₂ no transtorno bipolar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Alteração da fosfolipase A₂ tem sido descrita em diversas doenças neuropsiquiátricas. Esta enzima é responsável pelo metabolismo dos fosfolípidos de membrana e parece estar envolvida na fisiopatologia do transtorno bipolar. Neste estudo, foram analisados os três principais subtipos da PLA₂ (sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂) em plaquetas de pacientes e indivíduos controles. A atividade de subtipos de PLA₂ foi determinada em 20 pacientes TB sem tratamento com estabilizadores de humor e após seis semanas de tratamento com lítio; 72 pacientes medicados e 65 controles (16 pareados com os pacientes sem tratamento e 49 com os pacientes previamente medicados), pelo método radioenzimático. Os pacientes foram diagnosticados e classificados de acordo com os critérios estabelecidos no DSM-IV-TR. Foi verificado que Os pacientes no estágio inicial da doença apresentaram menor atividade de iPLA₂, sPLA₂ e cPLA₂ quando comparadas ao grupo controle. Seis semanas de tratamento com o lítio não foram suficientes para observar alterações nos resultados obtidos. No entanto, o lítio diminuiu a sintomatologia maníaca e a depressiva, avaliadas pelas escalas de Hamilton e Young, respectivamente ($p < 0,01$ para as duas comparações). Os pacientes medicados não diferiram do grupo controle para os três subtipos de PLA₂ avaliados. Estes resultados sugerem que no estágio inicial do TB há uma diminuição da atividade das PLA₂, e que a ação de um ou mais medicamentos que são incluídos na terapêutica para este transtorno podem reverter essa diminuição. Sugere-se ainda que a diminuição da atividade da iPLA₂ no estágio inicial do transtorno bipolar, além de alterar o remodelamento da membrana, possa ser um fator de risco para o desenvolvimento de demência nestes pacientes.

Descritores: Transtorno Bipolar; Fosfolipases A₂; Plaquetas.

ABSTRACT

Ikenaga, EH. Phospholipases A₂ activity on bipolar disorder [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Changes in phospholipase A₂ have been reported in several psychiatric disorders. This enzyme is responsible for the metabolism of membrane phospholipids and has been suggested to play a role in bipolar disorder physiopathology. In this study, the activity of the three main subtypes of phospholipase A₂ (PLA₂) were analyzed (sPLA₂, cPLA₂ and iPLA₂) in platelets of BD patients and health subjects. Subjects enrolled were: 20 drug-naïve and drug free BD patients, who were treated with lithium for six weeks; 72 BD long-term treatment patients and 65 controls (16 for the drug-naïve and drug free and 49 for the long term group). PLA₂ subtype activities were determined by the radio enzymatic method. Patients' diagnostic and classification were made according to DSM-IV-TR criteria. Patients at the early stage of the disease presented lower iPLA₂, sPLA₂ and cPLA₂ activity than the control group. Six weeks treatment with lithium did not change these activities. However, lithium reduced the maniac and depressive symptoms, evaluated with Hamilton and Young scales, respectively ($p < 0.01$, for both comparisons). Long-term treated patients presented similar PLA₂ activities to control group. The results suggest that at the early stage of BD iPLA₂ activity is decreased and that the adequate treatment of BD could reverse this reduction. We suggest that a reduction of iPLA₂ activity at the early stage of BD can modify the membrane metabolism, and could be a risk for the development of dementia in BD patients.

Descriptors: Bipolar Disorder; Phospholipases A₂; Platelets.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno bipolar

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno mental crônico, caracterizado por períodos de elevação do humor com períodos de depressão. (APA, 2002; Pereira et al., 2010; Post et al., 2010). Trata-se de uma patologia psiquiátrica grave, que envolve aspectos neuroquímicos, cognitivos, psicológicos, funcionais e socio-afetivos. O TB está associado a altos índices de mortalidade, comorbidades e prejuízos sócio-econômicos. (Suppes; Dennehy, 2009).

1.2 Quadro Clínico

Conforme critérios do DSM-IV-TR (APA, 2002), os transtornos bipolares fazem parte dos transtornos do Eixo I e dividem-se em TB-I, TB-II e transtorno Ciclotímico, além dos Transtornos do Humor Bipolar sem outra especificação (TB-SOE). A característica essencial do TB I é um curso clínico caracterizado pela ocorrência de um ou mais Episódio Maníacos ou Episódios Mistos, geralmente acompanhados por Episódios Depressivos Maiores. O TB II é caracterizado por um ou mais Episódios Depressivos Maiores, acompanhado por pelo menos um Episódio Hipomaníaco e TB-SOE (APA, 2002; Pereira et al., 2010).

1.3 Epidemiologia e hereditariedade

Este transtorno acomete de 1,3% a 1,6% da população geral (Sansone; Sansone, 2011) e é igualmente prevalente em homens e mulheres. O risco de adoecimento é de aproximadamente 1% no decorrer da vida. No entanto, quando existem parentes de primeiro grau acometidos com esse transtorno, a possibilidade de ocorrer o desenvolvimento da doença é de aproximadamente 7% (Gould; Manji, 2002, Duffy , 2010, 2009).

A idade de início da doença começa na infância, havendo também casos que se iniciam após a 6ª década de vida (Gould; Manji, 2002; Faedda et al., 2004; Shulman; Fu-I, 2004; Post et al., 2010). Em um estudo de coorte foi observado que 50% dos pacientes tiveram o primeiro episódio da doença na infância ou adolescência, e ainda sugeriu-se que o tratamento tardio se associou a mais riscos aos pacientes, com a presença de maior número de cursos adversos da doença quando se tornaram adultos (Post et al., 2010).

2. Revisão literária

2.1 Achados biológicos

As teorias iniciais a respeito da fisiopatologia do TB focaram-se no sistema de neurotransmissão das aminas biogênicas, visto que, inicialmente, hipotetizou-se que a depressão e a mania resultariam de uma diminuição no transporte de transmissores no neurônio pré-sináptico e/ou nas vesículas sinápticas. Entretanto, modelos de TB focados em sistema de neurotransmissor ou neuromodulador não conseguem explicar suficientemente

as diversas apresentações clínicas deste transtorno (Frey et al., 2004, Kapczinsk, 2004).

Em estudos morfológicos tem demonstrado um aumento do terceiro ventrículo lateral (Soares et al., 2005), redução da massa cinzenta em hipocampo e cerebelo (Moorhead et al., 2007), e também redução do volume pré frontal nos pacientes com TB (Blumberg et al., 2006, Soares et al., 2005). E em outro estudo *post mortem*, em análises de neuroimagem de pacientes com TB, o resultado observado foi uma diminuição significativa do volume de determinadas regiões do sistema nervoso central (SNC), acompanhada de perda ou atrofia das células nervosas, principalmente das células gliais. No entanto, ainda não está determinado se esses resultados representam alterações precoces na migração neuronal, perdas celulares decorrentes da própria progressão da doença, alterações bioquímicas que acompanham as crises de humor ou a ação dos diversos medicamentos utilizados (Machado-Vieira et al., 2003; Frey et al., 2004, Kapczinsk, 2004). É possível que esse fato seja devido à complexidade do TB e à variabilidade de características clínicas e de curso.

2.2. Tratamento medicamentoso

O lítio é considerado o fármaco mais eficaz no tratamento do TB. Apesar de seu sucesso, o seu mecanismo de ação na terapia e a razão do efeito tóxico não estão totalmente esclarecidos (Spiegelberg et al., 2005). No entanto, há relatos na literatura sobre possíveis efeitos nefrotóxicos causados pelo lítio, que podem ser devido à sua semelhança química com o sódio e sua

eliminação exclusiva pelos rins, sendo livremente filtrado pelos glomérulos (Oliveira et al., 2010).

Apesar das evidências de possíveis efeitos tóxicos, alguns estudos realizados demonstraram que o lítio está relacionado a possíveis efeitos neuroprotetores observados *in vitro* e *in vivo*, como menor morte celular e efeito anti-apoptótico. Talvez esse efeito neuroprotetor seja decorrente da ação do lítio como potente inibidor da enzima glicogênio sintase quinase 3-beta (GSK-3B), envolvida no processo de formação das lesões neuropatológicas, depleção colinérgica e morte celular (Gould; Manji, 2002; Nunes et al., 2002). Em outras pesquisas realizadas com pacientes bipolares, foi sugerida a redução do risco de desenvolvimento de demência após continuação do tratamento com lítio, e esta associação não foi observada em pacientes que continuaram o tratamento com anticonvulsivantes, antidepressivos ou antipsicóticos (Nunes et al., 2007; Kessing et al., 2010). Além disso, Kessing e Andersen (2004) sugeriram que o risco de desenvolver demência aumentava com novos episódios do TB.

Outros fármacos fazem parte do arsenal terapêutico do TB em momentos específicos durante o tratamento. Por exemplo, é comum a associação entre os estabilizadores de humor e outros fármacos com ação no sistema nervoso central com o intuito de se obter um efeito sinérgico ou pelo menos aditivo da medicação (Moreno et al., 2004). Dentre estes, destaca-se o uso regular de valproato, carbamazepina, lamotrigina e outros anticonvulsivantes em associação ou em substituição ao lítio (Moreno et al., 2004). Os antipsicóticos são utilizados rotineiramente no tratamento da fase aguda de mania em associação com os estabilizadores do humor. Dentre estes, ressaltam-se a

administração de haloperidol, olanzapina e risperidona (Moreno et.al., 2004; Cheon et al., 2011). Os antidepressivos não parecem possuir maior eficácia do que os estabilizadores do humor e ainda apresentam o risco de indução de mania, hipomania e ciclagem rápida (Montgomery et al., 2000). No entanto, na fase depressiva, as diferentes classes de antidepressivos (bupropiona e os inibidores seletivos da recaptação da serotonina) podem ser empregadas tanto na depressão maior como na leve (Compton; Nemeroff, 2000).

Embora se tenha o conhecimento dos mecanismos intracelulares dos principais estabilizadores de humor obtido por meio de estudos farmacológicos, ainda não há um tratamento único ou uma única combinação de tratamentos que funcione em todos os pacientes (Moreno et al., 2004), dificultando assim na seleção de medicamentos (Fu-I, 2004; Correll, 2008; Post et al., 2010).

Todavia, Frey et al. (2004) sugerem que o envolvimento do sistema de segundos mensageiros faça parte das alterações neurobiológicas do TB, concluindo ainda que as pesquisas que possibilitam um estudo direto de resolução celular e molecular são de fundamental importância. No entanto, estudos descritos na literatura sugeriram que vias moduladas pelas fosfolipases poderiam estar envolvidas no mecanismo fisiopatológico do TB (Hibbeln et al., 1989; Horrobin; Bennett, 1999a; Horrobin; Bennett, 1999b). Estes dados estão em consonância com outros relatos da literatura que demonstraram uma maior atividade das fosfolipases A_2 em quadros psiquiátricos como transtornos afetivos (Hibbeln et al., 1989, Ross et al., 2006) e esquizofrenia (Gattaz et al., 1990, 1995a). Foi sugerido que uma maior ativação dessas enzimas conduziria ao incremento da liberação de ácidos graxos precursores das prostaglandinas, o que potencializaria os processos de

transdução de sinais em um estado que, posteriormente, poderia resultar em importante perda das reservas destes ácidos graxos bioativos. Neste ponto, o mecanismo de transdução de sinais seria prejudicado pela impossibilidade de liberação de níveis adequados destes mediadores intracelulares (Hibbeln et al., 1989; Horrobin; Bennett, 1999a; Horrobin; Bennett, 1999b).

Assim, este projeto foi desenvolvido com o propósito de investigar a possível alteração da atividade de três subtipos da PLA₂, que são: a fosfolipase secretória (sPLA₂), a fosfolipase citosólica (cPLA₂) e a fosfolipase independente de cálcio (iPLA₂). Alguns estudos (Hilbbsen et al., 1989; Murakami; Kudo, 2002) que serão descritos ao longo do texto foram utilizados como embasamento científico acerca da participação da PLA₂ e/ou seus produtos como importantes mediadores para a homeostase celular.

2.3 Metabolismos de fosfolípides da membrana

A análise química de membranas isoladas de diversas fontes revela certas propriedades comuns a todas elas (Murakami, Kudo, 2002, Devlin, 1997, 2011; Nelson; Cox, 2011). Lípides e proteínas são os dois principais componentes das membranas celulares. Glicerofosfolípides, glicolípides e colesterol são os três principais componentes lipídicos das membranas, sendo os glicerofosfolípides os mais abundantes (Murakami; Kudo, 2002; Devlin, 1997, 2011; Nelson; Cox, 2011).

A estrutura dos glicerofosfolípides forma uma bicamada lipídica, estrutura básica de todas as membranas biológicas, na qual a cabeça polar está na interface entre o meio aquoso e o lipídico, e as caudas hidrofóbicas interagem

para formar um ambiente que exclui a água (Figura 1) (Murakami; Kudo, 2002; Devlin, 1997, 2011; Nelson; Cox, 2011).

Figura 1: Estrutura esquemática da bicamada fosfolipídica
Fonte: www.biologycorner.com/resources/lipidbilayer.gif

Os glicerofosfolípides têm uma molécula de glicerol como o componente básico, ao qual um fosfato (PO_4^{3-}) é esterificado no carbono na posição *sn*-3 e dois ácidos graxos (caudas hidrofóbicas) são esterificados nos dois átomos de carbono remanescentes (posições *sn*-1 e *sn*-2). O glicerol e o PO_4^{3-} são partes da cabeça polar (ou hidrofílica) dos fosfolípides (Figura 2) (Murakami; Kudo, 2002; Devlin, 1997, 2011; Nelson; Cox, 2011). As principais bases ligadas ao fosfato são: colina, etanolamina, serina, glicerol e inositol, formando os glicerofosfolípides, denominados consequentemente como: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol, respectivamente (figura 3) (Murakami, Kudo, 2002; Devlin, 1997, 2011).

Na posição *sn*-1 é geralmente encontrado um ácido graxo saturado, como ácido palmítico (16:0) (número de carbonos: número de ligações insaturadas) ou esteárico (18:0), e na posição *sn*-2 é geralmente encontrado um ácido graxo

insaturado, como ácido oleico (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3) ou araquidônico (20:4). O grau de insaturação dessas moléculas determina o arranjo espacial bem como a fluidez da membrana (Murakami; Kudo, 2002; Nelson; Cox, 2011).

Figura 2: Estrutura molecular dos fosfolípides de membrana

Figura 3: Estrutura molecular dos dois fosfolípides de membrana mais comuns
Fonte: Devlin, 2011

Os fosfolípides conferem estabilidade, fluidez e permeabilidade à membrana celular e é nela que se inserem os receptores, canais iônicos e outras proteínas envolvidas na transdução de sinais inter e intracelulares (Figura 4) (Murakami, Kudo, 2002, Fenton et al., 2000).

Figura 4: Estrutura da membrana plasmática.

A bicamada lipídica (camada dupla de lipídeos) é uma estrutura comum a todas as membranas biológicas e nela que inserem as proteínas, receptores e canais iônicos, envolvidas na transdução de sinais inter e intracelulares

Fonte: Nelson; Cox, 2011.

Assim, lípidos não são somente o principal componente da membrana celular, mas também estão envolvidos na regulação da membrana e de proteínas, fusão vesicular e sinalização (Murakami, Kudo, 2002; Dennis et al., 2011; Nelson; Cox, 2011). O metabolismo dos fosfolípidos é regulado por hormônios como os glicocorticoides, o glucagon, a insulina e os hormônios tireoideanos, além de outros cofatores (Horrobin et al., 1994).

A síntese dos fosfolípidos ocorre a partir da ligação dos ácidos graxos às moléculas de carbono do glicerol, pela ação dos sistemas enzimáticos da aciltransferase e da transacilase que, juntamente com as fosfolipases A_2 , (PLA_2) são responsáveis pelo remodelamento dos fosfolípidos, processo que ocorre durante todo o tempo de vida da membrana celular e é crucial para a manutenção da homeostase celular (Horrobin et al., 1994; Nelson; Cox, 2011).

2.4 Fosfolipase A_2

A fosfolipase A_2 compreende uma superfamília de enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem do éster ligado à posição *sn*-2 de glicerofosfolípidos de membranas celulares (Dennis, 1997; Murakami, Kudo, 2002). A hidrólise na posição *sn*-2 na membrana de glicerofosfolípidos origina ácido araquidônico, um precursor de eicosanoides incluindo prostaglandinas e leucotrienos. A mesma reação também produz lisofosfolípidos, que representam outra classe de precursores de mediadores lipídicos (Figura 5) (Murakami; Kudo, 2002; Schaloske; Dennis, 2006).

Figura 5: Atuação da fosfolipase A₂ na membrana celular

Fonte: www.asma-bronquica.com.br (imagem modificada)

Legenda: Prostaglandina (PG), Ciclooxygenase (CO), Leucotrienos (LT), Tromboxanos (TX), 5-Lipoxigenase+proteína ativadora (5-LO+FLAP), 5- hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE)

Foram identificados e caracterizados dezesseis grupos da enzima PLA₂ e pelo menos 29 subgrupos de PLA₂ de mamíferos. Estas compõem seis distintos tipos de enzimas, que são chamadas como: PLA₂ intracelular independente de cálcio ou PLA₂ independente de cálcio, PLA₂ extracelular dependente de cálcio ou PLA₂ secretória, PLA₂ intracelular dependente de cálcio ou PLA₂ citosólica, fator ativador de plaquetas - acetilhidrolase (PAF-AH), PLA₂ lisossomal e PLA₂ adiposo (Murakami, Kudo, 2002; Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011).

2.4.1 PLA₂ independente de cálcio – iPLA₂

As iPLA₂ são enzimas Ca⁺² independentes e estão localizadas no citosol. As iPLA₂ geralmente possuem um elevado peso molecular (28-146 kDa), e, tal como a cPLA₂, utilizam a serina para catálise da clivagem da ligação éster na posição *sn*-2 (Kudo; Murakami, 2002; Schaloske; Dennis, 2006). No entanto, a PLA₂ GVI não mostra especificidade para ácido araquidônico na posição *sn*-2 como a cPLA₂ GIV (Kudo; Murakami, 2002; Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011).

O grupo da iPLA₂ está subdividido em: iPLA₂ (GVIA-1), iPLA₂β (GVIA-2), iPLA₂γ (GVIB), iPLA₂δ (GVIC), iPLA₂ε (GVID), iPLA₂ζ (GVIE) e iPLA₂η (GVIF) (Kudo; Murakami, 2002; Schaloske; Dennis, 2006; Dennis, 2011).

A mais estudada enzima deste grupo é a iPLA₂ do grupo VIA (GVIA), e esta tem se mostrado importante na homeostase e remodelamento da membrana. Parece que esta enzima é a PLA₂ primária para a função metabólica entre as células (Dennis et al., 2011).

É sugerido que a atividade da PLA₂ do GVIA é regulada por diferentes mecanismos, incluindo ligação por ATP, clivagem de caspase, calmodulina e possível repetição de uma proteína chamada ankyrin mediada por uma agregação proteica (Dennis et al., 2011). Esta enzima libera AA resultando na formação de eicosanoides (Schaloske; Dennis, 2006).

A PLA₂ do GVIA parece estar envolvida na proliferação ou morte celular, progressão do ciclo celular, apoptoses, função e disfunção no sistema nervoso, neurodegeneração por acumulação de ferro, comprometimento da memória, secreção da insulina induzida pela glicose e as funções podem variar de

acordo com tipos de células e tecidos (Kudo; Murakami, 2002; Dennis et al., 2011).

2.4.2 PLA₂ secretória - sPLA₂

As sPLA₂ são proteínas secretadas com peso molecular entre 13-19 kDa (exceto para o grupo III da sPLA₂) e normalmente contêm 6 a 8 ligações dissulfeto. Este grupo de enzima utiliza um sítio ativo de histidina/ ácido aspártico e requer níveis milimolares (mM) de cálcio (Ca⁺²) para catálise da reação (Murakami, Kudo, 2002; Dennis et al., 2011). Uma das funções da sPLA₂ em mamíferos é a liberação de AA que é subsequentemente convertido em eicosanoides (Murakami, Kudo, 2002; Schaloske; Dennis, 2006). No total são incluídas 17 formas da sPLA₂ e dentre estes, dez membros da família da sPLA₂ foram identificados em mamíferos e são classificados como: grupos IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X e XII (Dennis et al., 2011). A sPLA₂ foi identificada também em insetos, moluscos, répteis, plantas e bactérias (Murakami, Kudo, 2002; Dennis et al., 2011). Este grupo de enzima está envolvido em vários processos biológicos, incluindo a modificação na geração de eicosanoides, a inflamação e também possui um papel de proteção (Kudo; Murakami, 2002; Dennis et al., 2011).

2.4.3 PLA₂ citosólica – cPLA₂

A família das PLA₂ citosólica consiste de seis enzimas: cPLA₂α, cPLA₂β, cPLA₂γ, cPLA₂δ, cPLA₂ε e cPLA₂ζ. As cPLA₂ são proteínas citosólicas com

elevado peso molecular, sendo encontradas enzimas com 85, 114, 61 e 92-93 kDa e no sítio catalítico é encontrada uma serina/ ácido aspártico (Murakami, Kudo, 2002; Schaloske; Dennis, 2006, Dennis et al., 2011). Estas são dependentes de Ca^{2+} em concentrações micromolares e de reação de fosforilação para sua atividade (Murakami, Kudo, 2002; Schaloske; Dennis, 2006).

As $\text{cPLA}_2\alpha$ pertencem ao grupo IVA (GIVA) e são reguladas pelo Ca^{+2} . Ao contrário do que se observa para a sPLA_2 , o Ca^{+2} não é requerido para catálise, mas para translocação da enzima para a membrana intracelular por meio da ligação com domínio C2. As $\text{cPLA}_2\alpha$ têm maior afinidade por fosfolípidos contendo AA na posição *sn*-2. Este grupo também pode se ligar e ser ativado por fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2). Além disso, PIP_2 e fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato ativam a $\text{cPLA}_2\alpha$ de modo Ca^{+2} independente. O domínio C2 é necessário para equilibrar a ativação Ca^{+2} independente da enzima. Isto indica que o domínio C2 apresenta um papel essencial na ligação interfacial da PLA_2 do GIVA. Atualmente, tem sido sugerido que PIP_2 facilita a translocação da $\text{cPLA}_2\alpha$ para a membrana perinuclear na baixa concentração de Ca^{+2} citosólico por servir como uma molécula de apoio (Kudo; Murakami, 2002; Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011).

As $\text{cPLA}_2\beta$ são do grupo IVB (GIVB), contêm um domínio C2 e são reguladas pelo Ca^{+2} . Tanto as $\text{cPLA}_2\beta$ e $\text{cPLA}_2\gamma$ (GIVC) demonstraram pequena especificidade ao ácido graxo na posição *sn*-2; já as $\text{cPLA}_2\delta$ (GIVD) têm maior afinidade para o ácido linoleico. A presença de Ca^{+2} livre pode se tornar essencial para a sua ativação (Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011).

As PLA₂ deste grupo estão envolvidas na inflamação, úlcera intestinal, prejuízo pulmonar agudo, prejuízo cerebral, como isquemia, e anafilaxia (Murakami, Kudo, 2002; Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011).

2.4.4 Outras classes dos subtipos da PLA₂

Dois grupos da PLA₂ serina formaram o GVII e GVIII da PLA₂, os quais podem hidrolisar o grupo acetil da posição *sn*-2 do PAF (fator ativador de plaquetas) e consequentemente originar a PAF-AH (fator ativador de plaquetas-acetilhidrolase) (Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011). Esta família de PLA₂ contém quatro enzimas que necessitam de um substrato específico (GVIIA, GVIIIB, GVIIIA e GVIIIB), que hidrolisam e inativam o mediador lipídico PAF (Kudo; Murakami, 2002; Dennis et al., 2011). O subtipo GVIIA é secretado e é também conhecido como plasma PAF-AH ou PLA₂ lipoproteína-associado (Lp-PLA₂). As duas outras enzimas, GVIIIB e GVIII são enzimas intracelulares (Schaloske; Dennis, 2006). A degradação desses fosfolípides bioativos pela PAF-AH pode levar a alteração da reação inflamatória e arterosclerose (Kudo; Murakami, 2002; Dennis et al., 2011).

De acordo com a nomenclatura da superfamília da PLA₂, a enzima PLA₂ lisossomal GXV é conhecida como PLA₂ do GXV (Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011). A PLA₂ do GXV, localizada nos lisossomos, possui peso molecular de 45 kDa. Esta enzima tem preferência para hidrolisar fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011). A atividade das PLA₂ do GVII, GVIII e GXV são todas independentes de cálcio (Kudo; Murakami, 2002; Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011).

Outro tipo da PLA₂ é a fosfolipase A₂ adiposo ou AdPLA₂. Esta enzima é expressa em vários tecidos, sendo o tecido adiposo aquele com a maior expressão. Possui baixo peso molecular (18 kDa), é independente de cálcio e pertence ao grupo XVI (GXVI). Está envolvida na produção de eicosanoides em tecido adiposo (Kudo; Murakami, 2002; Schaloske; Dennis, 2006; Dennis et al., 2011).

2.4.5 PLA₂ como alvo terapêutico

Com o passar do tempo, parece que a PLA₂ está atraindo a atenção das indústrias farmacêuticas, apresentando-se como um candidato atrativo para intervenção farmacológica no tratamento de algumas patologias. De acordo com a revisão realizada por Dennis et al. (2011), a família da PLA₂ foi se destacando e alguns laboratórios focaram no desenvolvimento de potentes e seletivos inibidores específicos da PLA₂ para aplicação em doenças específicas. Dentre essas possibilidades, exemplifica-se a produção no ano de 1985 de um potente inibidor da sPLA₂ do GIIA (LY315920) a base de indol, a *Varespladib Methyl*, um medicamento produzido pelo Laboratório *Lilly Research*, o qual foi utilizado para tratamento de sepse grave em um ensaio clínico, mas o tratamento foi descontinuado na fase II quando os resultados não atingiram a expectativa do estudo. Anos depois (2008), *Anthera Pharmaceuticals* produziu um inibidor também da sPLA₂ chamado de A-002 para tratamento de doenças cardiovasculares que está na fase III; neste caso, ainda não se sabe se este medicamento será útil dentro da prática clínica para esta doença.

Além da sPLA₂, a cPLA₂ também chamou a atenção, desta vez da *Wyeth* (agora parte da *Pfizer*) que desenvolveu um inibidor indol para artrite reumatoide. Porém, o tratamento foi desconsiderado na fase II da triagem após descompensações gastrintestinais e efeitos lipídicos (Dennis et al., 2011).

Já a iPLA₂ tem recebido menor atenção como alvo terapêutico. Todavia, recentes estudos com modelos animais têm demonstrado a importância desta enzima em doenças neurológicas (Dennis et al., 2011). Dennis et al. (2011) acreditam ainda, que a continuação das pesquisas tanto com inibidores da cPLA₂ e iPLA₂ podem promover novos potentes medicamentos que eventualmente poderão evoluir nas triagens clínicas.

2.5 Alterações da PLA₂ em doenças neuropsiquiátricas

Alterações do metabolismo de fosfolípidos de membrana neuronal, principalmente da atividade da PLA₂, já foram descritos em pacientes com esquizofrenia, transtorno bipolar, doença de Alzheimer e epilepsia (Gattaz et al., 1987; 1990; 1995a; 1995b; 1996; 2000; 2011; Ross et al., 1999; 2006; Tavares et al., 2003; Chalbot et al., 2009).

2.5.1 Esquizofrenia

Gattaz et al. (1987, 1990, 1995a) observaram um aumento da atividade de um tipo de PLA₂ (cálcio dependente) no sangue, no soro e nas plaquetas de pacientes com esquizofrenia.

Ross et al. (1999) observaram um aumento da atividade da PLA₂ em córtex temporal (análises *post mortem*) de pacientes com esquizofrenia. Em outro estudo, foi encontrada quantidade aumentada de cPLA₂ em hemácias de pacientes com esquizofrenia quando comparados com grupo controle (MacDonald et al., 2004).

Em outro estudo, utilizando soro de pacientes com esquizofrenia, desta vez comparando pacientes em primeiro episódio psicótico com pacientes crônicos (multi-episódicos) e controles, foi verificado um aumento na atividade da PLA₂, sendo significativo apenas em pacientes de primeiro episódio, tanto em relação a controles como aos pacientes crônicos (Smesny et al., 2005).

Para averiguar se as alterações nas membranas observadas em tecidos periféricos também ocorrem em tecido cerebral, foi realizado um estudo *post mortem* analisado a região do caudado de sujeitos com esquizofrenia. Foram encontradas quantidades significativamente menores de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) quando comparado a controles saudáveis ou a outras desordens mentais (não houve diferença significativa entre os grupos controles) (Yao et al., 2000).

Recentes achados demonstraram uma correlação significativa entre aumento da atividade da PLA₂ e mudanças estrutural em tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia, ao avaliar os parâmetros da fluidez da membrana do córtex pré-frontal (Eckert et al., 2011).

Embora Noponen et al. (1993) tenham confirmado o aumento da atividade da PLA₂ plasmática em esquizofrenia; neste estudo o aumento foi também indicado em outros pacientes psiquiátricos sem esquizofrenia, questionando assim a especificidade deste achado para a esquizofrenia. Baseado nestes

dados é possível especular que subtipos de PLA₂ estejam envolvidos de maneira diferenciada nas diversas doenças neuropsiquiátricas, tornando-se necessário identificar qual (is) subgrupo (s) predominam nas diferentes matrizes biológicas de interesse e qual o envolvimento dos mesmos nestas patologias.

2.5.2 Doença de Alzheimer

As evidências do envolvimento da PLA₂ na memória de longa duração, bem como no processamento da proteína precursora da amiloide (APP), são de grande interesse em vista de achados anteriores de nosso laboratório mostrando uma redução da atividade da PLA₂ em homogeneizados dos córtices parietal e frontal *post mortem* de pacientes com doença de Alzheimer em correlação com a gravidade da demência e a densidade de placas neuríticas e de emaranhados neurofibrilares (Gattaz et al., 1995b; Schaeffer, 2004). Adicionalmente, foi encontrada uma redução da atividade da cPLA₂ e da iPLA₂ em homogeneizados *post mortem* do hipocampo e dos córtices temporal e parietal de pacientes com doença de Alzheimer (DA). Esta redução significativa da atividade da cPLA₂ foi de 38%, 41% e 18% no córtex temporal, córtex parietal e no hipocampo, respectivamente, e da atividade da iPLA₂ de 44%, 35% e 22% no córtex temporal, córtex parietal e no hipocampo, respectivamente (Ross et al., 1998). Estes dados reforçam a suposição de que a atividade reduzida da PLA₂ esteja relacionada com o metabolismo diminuído de fosfolípidos na doença de Alzheimer.

Em estudo realizado por Eckert et al. (2000), foi observada uma redução da fluidez na membrana em tecido cerebral de hipocampo *post mortem* de pacientes diagnosticados com a doença de Alzheimer. No entanto, Chalbot et al. (2009) encontraram um aumento significativo da atividade de sPLA₂ em pacientes com doença de Alzheimer em amostras de líquido cefalorraquidiano, quando comparados ao grupo controle, utilizando ensaio fluorimétrico. Tais pesquisadores acreditam que o aumento líquido da atividade de sPLA₂ poderá ser um possível candidato a biomarcador neuroinflamatório para a doença de Alzheimer.

2.5.3 Epilepsia

Pesquisas sobre alterações de PLA₂ na epilepsia são escassas. No entanto, em um estudo recente realizado por Gattaz et al. (2011), foi determinada a atividade dos subtipos da PLA₂ (sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂) em pacientes com epilepsia com sintomas psicótico e não psicótico, utilizando tecido cerebral do hipocampo obtido em cirurgias de lobotomia. Foi observado um aumento significativo da atividade da iPLA₂ em pacientes com sintomas psicóticos quando comparados aos pacientes sem sintomas psicóticos. Alguns pesquisadores acreditam que as possíveis alterações possam estar relacionadas com sintomas da doença (Ross et al., 2006), como será descrito no próximo item.

2.5.4 Transtorno bipolar

Ross et al. (2006) determinaram as atividades das PLA₂ cálcio independente e cálcio dependente em soro de pacientes bipolares do tipo I, e não foram observadas alterações significantes quando comparadas com indivíduos controles. No entanto, quando o mesmo grupo foi subdividido em pacientes com e sem histórico de psicose, foi observado um aumento da atividade da iPLA₂ nos pacientes com histórico de psicose. Ao comparar este dado com outros estudos que constataram um aumento da atividade da PLA₂ em esquizofrenia, este autor sugeriu que os resultados apresentados poderiam representar um aspecto bioquímico comum na doença psicótica (Ross et al., 2006).

No entanto, a hipótese de Hibbeln et al. (1989) sugere uma alteração na atividade da PLA₂ ou na sua regulação como um fator desencadeante da depressão. Estes pesquisadores (Hibbeln et al., 1989) sugerem que a excessiva atividade da PLA₂ altera a fluidez da membrana e a sua composição; consequentemente, há alteração da proteína dependente da membrana. A alteração destas proteínas é documentada em pacientes com depressão e pode ser avaliada pelo aumento da atividade da PLA₂. Distúrbios em outras proteínas de membrana dependentes, tirosina e triptofano hidrolase, podem explicar a hipótese amino biogênica. A inibição do receptor glicocorticoide e a ligação do receptor hormônio tireotropina (TRH) no seu respectivo ligante pela PLA₂ podem explicar a não supressão do paciente no teste da supressão da dexametasona e fraca resposta no teste da estimulação do TRH (Hibbeln et al.,

1989). Foi verificada uma correlação entre o aumento da atividade da PLA₂ e alteração dos seus reguladores fisiológicos (cálcio, cortisol, estrógeno, progesterona e prostaglandina E₂ – PGE₂) em alguns pacientes com transtorno bipolar (Hibbeln et al., 1989). Assim, alterações da PLA₂ podem estar envolvidas na depressão pós-parto e síndrome da tensão pré-menstrual. O mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos, lítio, eletroconvulsoterapia e alguns agentes anti maníacos inovadores pode ser descritos em termos de alterações da atividade da PLA₂. Interessantemente, o etanol altera a fluidez da membrana e a enzima ligada à membrana de um modo similar à excessiva atividade da PLA₂. O fator hereditário predisposto em pacientes com transtorno afetivo pode ser um gene defeituoso, ou da PLA₂ ou na sua regulação (Hibbeln et al., 1989).

Outra explicação seria que o aumento da perda de ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos de membrana, por excesso de atividade da PLA₂, estaria relacionado ao aparecimento de um transtorno de humor (Horrobin; Bennet, 1999b).

Em estudo utilizando plaquetas, não foi observada alteração na atividade total da PLA₂ entre indivíduos controles e pacientes psiquiátricos (depressão, transtorno bipolar e de personalidade) (Gattaz et al., 1995a).

Ross et al. (1999) não observaram um aumento da atividade da PLA₂ nas diferentes regiões cerebrais de pacientes com transtorno afetivo bipolar (*post mortem*) estudadas. Porém, Kim et al. (2011) observaram em tecido cerebral *post-mortem* de córtex frontal de 10 pacientes com TB que os níveis médios de proteína e de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) da cPLA₂ IVA e da sPLA₂ IIA estavam significativamente aumentadas quando comparados com o grupo

controle, mas esta diferença não foi observada na iPLA₂. Os métodos utilizados neste estudo foram *Real Time-PCR* e *Western blot*.

Meira-Lima et al. (2003) (amostra brasileira) e Dikeos et al. (2006) (amostra europeia) analisaram as variantes alélicas dos genes da sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂ em amostras de DNA do sangue e sugeriram que estes não estão associados com o aumento do risco para a suscetibilidade do TB, embora um estudo anterior tenha encontrado associação entre TB e um gene da PLA₂ (PLA₂ – no cromossomo 12q) (Dawson et al., 1995).

Além dos estudos em humanos, estudos de modelos animais foram realizados. Em estudos de tecido cerebral de ratos tratados cronicamente com lítio, foram observados a redução da atividade da PLA₂, inibindo a liberação de AA a partir dos fosfolípides da membrana. Estes dados foram obtidos por análise de mRNA ou por meio da determinação da atividade das fosfolipases por métodos radioenzimáticos ou fluorimétricos (Chang; Jones, 1998; Rapoport; Bosetti, 2002; Basselin et al., 2007; Rao et al., 2007). Em outro estudo, Weerasinghe et al. (2004) avaliaram ratos também tratados cronicamente com lítio e não observaram alteração na atividade da sPLA₂. Estes resultados indicam que o efeito do lítio é seletivo e está envolvido na via da cPLA₂/ COX-2, o qual poderia ser responsável pelo efeito terapêutico no TB.

Em outro estudo realizado em modelo animal com ratos Fisher adultos, foi observado que após seis semanas de tratamento com lítio, houve uma redução da expressão e do nível do RNAm da cPLA₂, mas não da iPLA₂, quando comparados com controles e também da quantidade de proteína da cPLA₂, avaliada pelo método de *Western blotting* (Rintala et al., 1999). Este grupo de pesquisadores sugeriram que a cPLA₂ poderia representar uma chave

enzimática envolvida na ação terapêutica do lítio e consequentemente no futuro, estudos poderiam ligar o efeito neurobiológico específicos do lítio crônico para seus específicos efeitos clínicos em pacientes bipolares (Rintala et.al.,1999). Apesar dos estudos já realizados, a regulação da atividade PLA₂ ainda representa ser de grande complexidade.

Quanto à seleção da matriz biológica e a escolha da metodologia para analisar a atividade de subtipos de PLA₂ em grupos de pacientes bipolares para este estudo, será descrita a seguir.

2.6 O uso de plaquetas como um possível modelo periférico de neurônios

A busca por marcadores que determinem as respostas terapêuticas e que possam controlar o desenvolvimento de uma doença é crescente. Nos distúrbios mentais, as determinações no SNC são difíceis e também têm suas limitações (Barradas; Mikhailidis, 1992). Em contraste, o acesso venoso e a facilidade da obtenção e preparação das plaquetas faz com que alguns pesquisadores classifiquem as plaquetas como possível matriz periférica para se avaliar os mecanismos alvos dos estudos (Barradas; Mikhailidis, 1992).

O uso de plaquetas como modelo neurofarmacológico foi seguido porque em 1951, Rand e Reid publicaram que as plaquetas continham serotonina e logo em seguida foi descoberto que essa amina é um neurotransmissor. Além disso, as plaquetas têm muitos aspectos importantes em comum com os neurônios, a começar pela mesma origem embrionária, que é ectodérmica (Gresele et al., 2010). As plaquetas armazenam e liberam neurotransmissores (em grânulos densos); a liberação dos grânulos α e densos é regulada pelas

concentrações intracelular de cálcio; plaquetas expressam várias proteínas relacionadas a neurônios como os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e ainda, as plaquetas prolongam o processamento da membrana plasmática, lembrando neuritos que são esculpidos pelas proteases extracelulares (Bush; Tanzi, 1998). Ambas as células, plaquetas e neurônios, contêm a enzima monoamina-oxidase (MAO). Existem dois tipos de MAO: MAO-A (citoplasmática) e MAO-B (mitocondrial); as plaquetas contêm exclusivamente MAO-B e o tecido cerebral contém os dois tipos de MAO (Barradas; Mikhailidis, 1992). Contudo, as plaquetas há muitos anos são usadas como matriz biológica para observações clínicas para muitos transtornos neuropsiquiátricos, como depressão, esquizofrenia e doença de Alzheimer (di Luca et al., 2000).

Embora as plaquetas apresentem similaridades com os neurônios, elas diferem dos mesmos em alguns aspectos. Por exemplo, neurônios são estacionários e organizados em uma rede densa e complexa e as plaquetas são circulantes e elas interagem entre si por agregação. Elas também se comunicam e recebem mensagens de outras células e tecidos (leucócitos, hemácias e endotélio vascular). As plaquetas são anucleadas e têm vida curta (7 – 10 dias) quando comparadas com os neurônios (anos). Entretanto, apesar das plaquetas apresentarem-se como modelo incompleto em relação aos neurônios, diversas similaridades continuam assegurando que estas células permanecem como uma ferramenta útil para investigação de doenças mentais (Barradas; Mikhailidis, 1992).

De acordo com Padovani et al. (2001), as alterações das PLA₂, da fluidez da membrana, de níveis de proteína kinase C (PKC), dentre outros, permitem considerar as plaquetas como fonte de material biológico humano viável para

estudos de mecanismos metabólicos, espelhando perifericamente os processos metabólicos que ocorrem no SNC.

2.7 Princípios gerais para a determinação da atividade da PLA₂

A atividade da PLA₂ é uma medida estimada da quantidade de ácido araquidônico marcado liberado por meio de uma reação na qual a PLA₂ atua cataliticamente sobre o substrato L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina, marcado com ¹⁴C (PC¹⁴C) na cauda araquidonil na posição *sn*-2. A quantidade de ácido graxo é determinada através do ensaio radioenzimático (Flesch et al., 1985; Gattaz et al., 1995a; Talib et al., 2012) utilizando o aparelho específico para detecção de radiação beta.

O ensaio radioenzimático é realizado com a adição de um substrato exógeno à amostra, podendo esta ser de tecido cerebral, de plaquetas, ou de cultura de células (Gattaz et al., 1995a; Talib et al., 2008; Defilippo, 2009; Talib et al., 2012).

As enzimas diferem em seus substratos específicos: a sPLA₂ e cPLA₂ têm maior afinidade por ácido araquidônico ligado na posição *sn*-2 (Lee et al., 2007), já a iPLA₂ tem maior afinidade quando o ácido na posição *sn*-2 dos fosfolípides for o ácido linoleico, ácido palmítico, o ácido oleico ou o ácido docosahexaenoico (Green et al., 2008; Talib et al., 2012).

Nesse ensaio é utilizado um tampão de lise (Tris-sacarose 50 mM pH 7,4) durante a homogeneização da amostra para romper as membranas e, assim, permitir a incorporação do substrato marcado aos fragmentos de membrana. Entretanto, também é necessária a adição de um tampão de lipossomos (Tris-

HCl 50 mM pH 7,4) para simular um ambiente celular, unindo os fragmentos de membranas contendo o substrato marcado. A reação referente à ação catalítica da PLA₂ sobre o substrato ocorre durante um período de incubação à 37 °C sob agitação. Após este período, a reação é interrompida e é realizada a extração do ácido graxo marcado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade de subtipos de PLA₂ (sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂), com auxílio do método radioenzimático, em plaquetas de pacientes portadores de transtorno bipolar sem a presença de comorbidades psiquiátricas (esquizofrenia, doença de Alzheimer, transtorno obsessivo compulsivo, epilepsia entre outros) e compará-las com indivíduos sem histórico de tratamento psiquiátrico, buscando eventuais correlações com variáveis clínicas e biológicas.

3.2 Objetivos específicos

Verificar a influência da idade nos subtipos de PLA₂ por meio de comparações entre os grupos controles.

Verificar se existe correlação entre as atividades de subtipos de PLA₂ em plaquetas antes e após o tratamento com lítio e a sintomatologia depressiva, avaliada pela escala de Hamilton para depressão;

Verificar se existe correlação entre as atividades de subtipos de PLA₂ em plaquetas antes e após o tratamento com lítio e a sintomatologia maníaca, avaliada pela escala de Young;

Verificar como estes subtipos da PLA₂ (sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂) apresentam-se em grupo de pacientes com TB virgens de tratamento medicamentoso e se as mesmas comportam-se sem alteração após seis semanas de tratamento com lítio;

Comparar as atividades enzimáticas de subtipos de PLA₂ nos pacientes avaliados (virgens de tratamento; após a administração de lítio por seis semanas; medicados há pelo menos um ano) com grupos controles pareados por sexo e idade;

Comparar as atividades enzimáticas de subtipos de PLA₂ nos pacientes virgens de tratamento ou após o tratamento com lítio por seis semanas com aquelas de pacientes em tratamento medicamentoso há pelo menos um ano;

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido nas dependências do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq/ HCFMUSP) e todas as análises foram realizadas no Laboratório de Neurociências (LIM-27) do IPq/ HCFMUSP.

Após concordarem em participar do estudo, todos os participantes desta pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) em reunião realizada no dia 07 de abril de 2010, sob o número 0100/ 10 (Apêndice B).

4.1 Casuística

A atividade dos subtipos de PLA_2 (i PLA_2 , s PLA_2 e c PLA_2) foi investigada em 20 pacientes (primeira amostra) diagnosticados com TB tipo II, sendo 15 pacientes *drug naïve* e 5 pacientes sem medicamento por pelo menos um mês. Este grupo foi reanalisado após seis semanas de tratamento com lítio.

Além deste grupo, foram selecionados 72 pacientes (segunda amostra) com diagnóstico de TB I ou II com pelo menos um ano de tratamento, em seguimento ambulatorial no IPq/ HCFMUSP, utilizando mais de um tipo de medicamento. A sintomatologia depressiva e maníaca destes pacientes foi avaliada pela aplicação da escala de Hamilton para avaliação da depressão (HAM-D) (Hamilton, 1960) (Apêndice C) e Escala de Young para avaliação de

mania (YMRS) (Young et al., 1978) (Apêndice D). Foram excluídos aqueles com comorbidades psiquiátricas (esquizofrenia, doença de Alzheimer, transtorno obsessivo compulsivo, epilepsia entre outras). Foram selecionados dois grupos controles sem histórico de diagnóstico psiquiátrico.; um grupo controle com 16 sujeitos entre 22 a 30 anos para a primeira amostra e outro grupo com 49 sujeitos entre 30 a 68 anos, para a segunda amostra.

4.2 Coleta das amostras

As coletas de sangue foram realizadas sempre entre 8 e 10 horas da manhã e os pacientes estavam em jejum de 10 a 12 horas. O sangue coletado foi processado imediatamente após a coleta. Todo o procedimento de coleta e processamento da amostra foi realizado de acordo com protocolo padronizado no LIM-27.

4.3 Preparo da amostra

4.3.1 Lavagem das plaquetas

Foram coletados 30 mL de sangue em três tubos com capacidade de 10 mL contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106 mol/ L. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de ACD-NH [glicose 22,3 g; ácido cítrico 8,68 g; citrato de sódio di-hidratado 24,7 g; água ultra-pura quantidade suficiente para (qsp) 1 L]. Os tubos foram homogeneizados delicadamente por inversão e centrifugados durante 15 minutos a $512 \times g$ a 20°C. O sobrenadante (plasma rico em

plaquetas – PRP) foi transferido para outro tubo (tipo *Falcon*) com capacidade de 50 mL e o pH foi ajustado imediatamente para 6,5 com ACD-NH. Em seguida, o volume total foi distribuído em quatro tubos de poliestireno (4 a 5 mL/ tubo) e centrifugados por 10 minutos a 1153 x *g* a 20°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado por inversão. Na fase seguinte, foram adicionados 2,5 mL de solução de lavagem no tubo contendo o *pellet* (plaquetas). A solução de lavagem consistiu de 30 mL de citrato de sódio 0,1 M; 3,3 mL de cloreto de potássio 0,155 M; 1,0 mL de cloreto de magnésio 0,1 M; 1,5 mL de glicose 0,33 M; 2,5 mL de apyrase 2 mg/ mL (A6535, Sigma Aldrich); 0,25 mL albumina de soro bovino (BSA) 200 mg/ mL (Calbiochem); 2,0 mL de cloreto de cálcio 0,1 M e cloreto de sódio 0,9% qsp 100 mL. Após a incubação durante 10 minutos com a solução de lavagem, o *pellet* foi homogeneizado cuidadosamente com uma pipeta *Pasteur* até a total diluição. Em seguida, foram adicionados mais 2,5 mL de solução de lavagem; realizou-se a última centrifugação, por 8 minutos a 1153 x *g*. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado. Finalmente, as plaquetas (*pellet*) foram acondicionadas com 0,5 mL/ tubo de Tris-sacarose 50 mM pH 7,4 e homogeneizadas com uma pipeta automática. Após todas as etapas serem cumpridas, as plaquetas foram armazenadas em criotubos e mantidas em freezer – 70°C até a análise.

4.4 Determinações da atividade dos três subtipos de PLA₂

4.4.1 Determinação da concentração da proteína plaquetária

A primeira etapa para a realização do ensaio radioenzimático é a determinação da concentração de proteína de cada amostra, seguida da normalização da concentração inicial para 0,2 mg/ mL para cada amostra.

O método utilizado para determinar a concentração necessária de proteínas totais plaquetária foi colorimétrico, baseado no método de Lowry (Lowry et al., 1951) e modificado (kit Bio-Rad DC Protein Assay, Bio-Rad Hercules, CA, Estados Unidos). Este kit é composto pelo reagente A (solução alcalina de tartarato de cobre) e reagente B (reagente de Folin que é composto por 1,2 – *naphthoquinone-4-sulfonate*) e é utilizado em temperatura ambiente. Quando estes reagentes entram em contato com a proteína plaquetária, há uma redução pela perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio, mudando a cor da reação final, cuja absorbância é lida entre 405 e 750 nm (Peterson, 1979).

Para realização do ensaio foi necessário preparar uma curva padrão proteica de BSA com cinco concentrações diferentes (0,1 mg/ mL; 0,2 mg/ mL; 0,5 mg/ mL; 1,0 mg/ mL e 1,5 mg/ mL).

As amostras previamente armazenadas em freezer – 70°C foram descongeladas e mantidas no gelo. O procedimento consiste na adição de 5 µL do padrão de proteínas/ amostras / branco (tris sacarose 50 mM pH 7,4 – e este também foi o diluente das amostras, as quais foram diluídas 1:3, v/ v), 25 µL do reagente A e 200 µL do reagente B em uma placa de 96 poços. Logo em seguida a placa permaneceu por 15 minutos em um agitador de placas (Wallac – Perkin Elmer, Boston, MA, Estados Unidos), em 500 rotações por minuto. As análises foram feitas em triplicatas. Finalmente, após esta etapa, as absorbâncias das respectivas reações foram lidas em um leitor de microplacas

(Zenyth 200 Spectrophotometer, Áustria), no comprimento de onda fixo de 680 nm e o coeficiente de variação máximo observado foi de 5%.

4.4.2 Ensaio radioenzimático

Todas as amostras foram diluídas para 0,2 mg/ mL de proteína em 2,5 mL de volume final. Este volume consistiu em Tris-sacarose pH 7,4 (tampão de lise) para obter o volume final de 1000 μ L e foram adicionados 1500 μ L de Tris-HCl 50 mM pH 7,4. O branco foi preparado com 1000 μ L de Tris-sacarose pH 7,4 e 1500 μ L Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Após as diluições das amostras e brancos, foram pipetados 50 μ L de Tris-HCl 1,0 M para todos os tubos. Para as determinações das PLA₂ dependentes de cálcio, foram utilizados 100 μ L de soluções com concentrações otimizadas de cálcio para sPLA₂ e cPLA₂ (5 mM e 100 μ M, respectivamente). Para a determinação da iPLA₂ foram adicionados 100 μ L de ácido etileno diamino tetracético (EDTA). A seguir, foram adicionados 200 μ L da amostra ou do branco. Para a determinação das sPLA₂ e cPLA₂, foram adicionados 150 μ L (0,006 μ Ci) do substrato radioativo PC-¹⁴C (L-3-fosfatidilcolina, -1-palmitoil-2[1-¹⁴C]-araquidonil 1-¹⁴C); para a determinação da atividade da iPLA₂, foram adicionados 150 μ L (0,006 μ Ci) do L-3- fosfatidilcolina, 1-palmitoil- 2[1-¹⁴C] palmitoil como substrato radioativo. Todos os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a 37 °C em banho-maria (Shaking Bath SB-16, Techne) sob agitação. Após o término da incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo e em seguida foram adicionados 700 μ L de solução de parada (ácido clorídrico/ isopropanol, 1:12, v/ v), para interromper a reação. Na etapa seguinte, as

amostras ficaram em repouso por 10 minutos/ temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 700 μL de *n*-heptano para extração do ácido graxo marcado por meio da agitação rigorosa em vórtex por 30 segundos. Todos os tubos foram centrifugados a 1700 x *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, 500 μL da fase orgânica de cada tubo foram transferidos para outro tubo contendo 60 mg de sílica gel (para reter os fosfolípidos não clivados) e 300 μL de *n*-heptano. Novamente todos os tubos foram centrifugados a 1700 x *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, foram transferidos 500 μL do sobrenadante de cada tubo para os respectivos *vials* de cintilação contendo 6,0 mL de líquido de cintilação (Optiphase “Hisafe” 3, Perkin Elmer). Estes, por sua vez, foram homogeneizados e colocados no contador de cintilação líquida (Tri-Carb 2100 TR, Packard) na seguinte ordem: branco, 100% (somente o substrato marcado) e amostras. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata (branco, 100% de atividade radioativa e amostras). Os resultados foram fornecidos em contagem por minuto (CPM) e então, corrigidos para pmol/ mg/ min utilizando a seguinte fórmula para cada subtipo de PLA₂:

$$\text{Atividade da PLA}_2 \text{ (pmol/ mg proteína/ min)} = \text{CPM} \times 25 / \text{A} \times 0,954 \times 2,22 \times \text{B}$$

CPM = contagens por minuto; **25** = fator de ajuste para 1 mg de proteína (1 mg/ 0,04 mg concentração final de proteína); **A** = atividade específica do radioativo em mCi/mmol; **0,954** = eficiência do equipamento; **2,22** = para transformar a molaridade; **B** = tempo de incubação em minutos.

4.5. Dosagem de lítio

As dosagens do lítio das amostras de plasma foram realizadas em aparelho específico para esse fim (Roche, 9180 *Electrolyte Analyzer*) e os padrões utilizados foram kits da Roche chamados Isetrol.

4.6 Análises estatísticas

Para a comparação de médias entre dois grupos (controles X pacientes; controle jovem X controle adultos), foi utilizado o teste t-*Student* para amostras independentes. Para a comparação de médias de três grupos (controle X TB I X TB II; controle X TB II sem tratamento X TB medicados), foi utilizada a análise de variância (ANOVA). Para verificar associações entre variáveis categóricas (sexo x grupo de pesquisa), foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para verificar correlações entre as pontuações das escalas, a litemia e as medidas da atividade de PLA₂, foi calculado o coeficiente de correlação de *Spearman*. O nível de significância adotado foi de 0,05 e todos os testes foram bicaudais. As análises foram realizadas com auxílio do software *Statistical Package for Social Sciences* versão 14.0 para *Windows* (Chicago, IL, Estados Unidos) e *Graphpad Prism* versão 5.0 para *Windows* (La Jolla, CA, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

5.1. Primeira amostra:

5.1.1 Pacientes sem tratamento medicamentoso e grupo controle

Pacientes sem tratamento apresentaram menor atividade da iPLA₂, da sPLA₂ ($p < 0,01$) e da cPLA₂ ($p < 0,001$) em comparação aos controles (Gráficos 1, 2 e 3).

Gráfico 1. Atividade do subtipo iPLA₂ nos pacientes sem tratamento medicamentoso e no grupo controle jovem ** $p < 0,01$

Gráfico 2. Atividade do subtipo sPLA₂ nos pacientes sem tratamento medicamentoso e no grupo controle jovem ** $p < 0,01$

Gráfico 3. Atividade do subtipo cPLA₂ nos pacientes sem tratamento medicamentoso e no grupo controle jovem *** $p < 0,001$

5.1.2. Pacientes antes e após a administração de lítio por 6 semanas

O tratamento com carbonato de lítio por seis semanas não alterou as atividades da iPLA₂, sPLA₂ e cPLA₂ ($p = 0,897$, $p = 0,176$ e $p = 0,374$; respectivamente) (Gráficos 4, 5 e 6). Este achado negativo também se observou em pacientes tratados com lítio em monoterapia ($p = 0,892$ para a iPLA₂; $p = 0,118$ para sPLA₂ e $p = 0,190$ para a cPLA₂).

Gráfico 4. Atividade de iPLA₂ nos pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por 6 semanas

Gráfico 5. Atividade de sPLA₂ nos pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por 6 semanas $p = 0,176$

Gráfico 6. Atividade de cPLA₂ nos pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por 6 semanas $p = 0,374$

5.1.3 Pacientes após a administração de lítio por seis semanas e o grupo controle

Após a administração de lítio por seis semanas, os valores de $iPLA_2$, $sPLA_2$ e $cPLA_2$ continuaram menores no grupo de pacientes com TB nos estágios iniciais do que no grupo controle ($p = 0,018$; $p = 0,004$ e $p = 0,003$, respectivamente) (Gráficos 7, 8 e 9). E quando avaliados somente os 14 pacientes que receberam somente lítio, foi observado que as atividades de $iPLA_2$, $sPLA_2$ e de $cPLA_2$ continuaram menos que as do grupo controle ($p = 0,019$; $p = 0,007$ e $p = 0,002$, respectivamente).

Gráfico 7. Atividade de $iPLA_2$ de pacientes após a administração de lítio por seis semanas e grupo controle * $p < 0,05$

Gráfico 8. Atividade de sPLA₂ de pacientes após a administração de lítio por seis semanas e grupo controle ** $p < 0,01$

Gráfico 9. Atividade de cPLA₂ de pacientes após a administração de lítio por seis semanas e grupo controle ** $p < 0,01$

No grupo de pacientes livres de medicação ($n = 20$), dois apresentavam sintomas psicóticos. Ao retirarmos esses sujeitos da análise não houve alteração do resultado, ou seja, esses pacientes continuaram com atividade da sPLA₂ e da cPLA₂ ($p = 0,001$ para os dois subtipos) diminuídas em relação ao grupo controle.

5.1.4 Correlações entre as variáveis quantitativas estudadas

Não houve correlação entre os subtipos de PLA₂ após o tratamento com lítio e a litemia sérica (Gráficos 10, 11 e 12). Quando analisados os 14 pacientes aos quais foi administrado somente lítio, a mesma ausência de correlação foi observada (iPLA₂: $r = -,257$, $p = 0,274$; sPLA₂: $r = ,222$, $p = 0,346$ e cPLA₂: $r = ,186$, $p = 0,433$).

Gráfico 10. Correlação entre a atividade de iPLA₂ e a litemia dos pacientes com transtorno bipolar tipo II tratados com lítio durante seis semanas ($r = -,20$; $p = 0,401$)

Gráfico 11. Correlação entre a atividade de sPLA₂ e a litemia dos pacientes com transtorno bipolar tipo II tratados com lítio durante seis semanas ($r = ,37$; $p = 0,104$)

Gráfico 12. Correlação entre a atividade de cPLA₂ e a litemia dos pacientes com transtorno bipolar tipo II tratados com lítio durante seis semanas ($r = ,29$; $p = 0,217$)

Nos Gráficos 13 e 14 são apresentadas as distribuições da sintomatologia depressiva (Hamilton, 1960) e maníaca (Young et al., 1978) dos pacientes sem de tratamento medicamentoso (inicial) e após a administração de lítio por 6 semanas. Essas escalas foram aplicadas no mesmo dia da respectiva coleta de sangue. Seis pacientes necessitaram da inclusão de outro (s) medicamento (s) para um tratamento eficaz: os medicamentos administrados foram: risperidona (n = 1), alprazolam (n = 1), fluoxetina (n = 1), bupropiona (n = 1), levomepromazina (n = 1), oxcarbamazepina (n = 1), clonazepam (n = 3) e zolpidem (n = 1).

Observou-se uma melhora significativa dos sintomas depressivos após o tratamento com lítio por seis semanas ($p < 0,001$). Para a sintomatologia maníaca, não foi observada diferença na pontuação da escala antes e após o tratamento com lítio ($p = 0,347$). Quando avaliados somente os 14 pacientes aos quais foram administrados somente lítio, foi observada melhora dos sintomas depressivos e maníacos ($p < 0,01$ para as duas comparações). A litemia sérica desses pacientes variou de 0,23 a 0,97 mEq/ L após as seis semanas.

Gráfico 13. Pontuações na escala de Hamilton para avaliação de depressão para os pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por seis semanas *** $p < 0,001$

Gráfico 14. Pontuações na escala de Young para avaliação da mania para os pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por seis semanas $p = 0,347$

As variáveis testadas foram: atividade de sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂ dos pacientes sem tratamento e após a administração de lítio por seis semanas; a

litemia sérica no final de seis semanas e as pontuações das escalas de Hamilton-D para avaliação de depressão e de Young para avaliação de mania. As variáveis biológicas avaliadas não apresentaram correlação com a sintomatologia do transtorno. Esse resultado se manteve quando foram analisados os 14 pacientes que foram tratados somente com lítio (Tabela 1).

Tabela 1: Correlação entre a atividade dos subtipos de PLA₂ e a sintomatologia depressiva e maníaca dos pacientes

	HAM –D		YMRS	
	Correlação	p	Correlação	P
Pacientes virgens de tratamento				
sPLA ₂	,20	0,400	,30	0,203
cPLA ₂	,14	0,568	,34	0,143
iPLA ₂	,03	0,916	,04	0,854
Pacientes após uso de lítio por 6 semanas				
sPLA ₂	,23	0,328	,24	0,307
cPLA ₂	,17	0,476	,31	0,180
iPLA ₂	-,09	0,717	-,01	0,995
Litemia	,08	0,749	,01	0,954

HAM-D: Escala de Hamilton para avaliação de depressão, YMRS: Escala de Young para avaliação de mania; n = 20

5.1.5 Característica demográfica dos participantes

A idade e o sexo do grupo de pacientes sem tratamento e o seu respectivo grupo controle (Tabelas 2).

Tabela 2. Idade e sexo dos pacientes sem de tratamento medicamentoso e seu respectivo grupo controle

	Pacientes (n = 20)	Controles (n = 16)	p
Idade (anos)	28,5 ± 4,8	26,4 ± 4,4	0,193
Sexo feminino [n (%)]	16 (80)	8 (50)	0,123

Valores referentes a média ± desvio-padrão

Em relação a estas características, esse grupo não diferiu do grupo controle jovem.

5.2. Segunda Amostra:

5.2.1 Pacientes medicados há pelo menos um ano e grupo controle

Não foi observada diferença entre a atividade dos subtipos da iPLA₂, sPLA₂ e cPLA₂, entre o grupo controle (n = 49), TB I (n = 47) e TB II (n = 35) (p = 0,989; p = 0,147 e p = 0,846, respectivamente) (Gráficos 15, 16 e 17).

Gráfico 15. Atividade de iPLA₂ nos grupos de pacientes medicados há pelo menos um ano, diagnosticados com TB I ou TB II, e seu respectivo grupo controle $p = 0,989$

Gráfico 16. Atividade de sPLA₂ nos grupos de pacientes medicados há pelo menos um ano, diagnosticados com TB I ou TB II, e seu respectivo grupo controle $p = 0,147$

Gráfico 17. Atividade de cPLA₂ nos grupos de pacientes medicados há pelo menos um ano, diagnosticados com TB I ou TB II, e seu respectivo grupo controle $p = 0,846$

5.2.2 A influência da idade na atividade da PLA₂:

Para verificar se a idade tem alguma influência na atividade dos subtipos de PLA₂ avaliados, foi realizado o teste de correlação de Spearman. Encontramos uma fraca, porém significativa correlação negativa para os subtipos sPLA₂ e cPLA₂ ($r_s = -,191$, $p = 0,013$ e $r_s = -,334$, $p < 0,001$ respectivamente). Para o subtipo iPLA₂ não encontramos nenhuma correlação da atividade com a idade ($r_s = ,10$, $p = 0,2$) (Gráfico 18).

Gráfico 18: correlação entre a idade e atividades de $iPLA_2$, $sPLA_2$ e $cPLA_2$

5.2.3 Pacientes sem tratamento, pacientes medicados há pelo menos um ano e grupo controle

Conforme verificado anteriormente a $iPLA_2$ não sofre interferência da idade. Assim, utilizamos para as análises destes subtipos os dois grupos controles como um único grupo ($n = 65$) e foi avaliado conjuntamente os pacientes sem tratamento e os pacientes tratados há pelo menos um ano, uma

vez que a atividade de iPLA₂ também não variou de acordo com a classificação do transtorno (Gráfico 18).

Verificamos uma menor atividade da atividade da iPLA₂ no grupo de TB sem tratamento quando comparados ao grupo controle ($p = 0,005$) e ao grupo de TB tratados há pelo menos um ano ($p = 0,014$), sendo que o pacientes medicados há pelo menos um ano apresentaram atividade da iPLA₂ semelhante ao grupo controle ($p = 0,855$) (Gráfico 19).

Gráfico 19: Redução da atividade de iPLA₂ em plaquetas de pacientes sem tratamento comparada a determinações em controles e pacientes medicados há pelo menos um ano * $p < 0,05$

Ao controlar as análises deste grupo de pacientes retirando aqueles com presença de sintomas psicóticos, a diminuição da atividade da iPLA₂ permaneceu significativa ($p = 0,02$). O mesmo resultado foi observado quando a análise foi realizada somente com os grupos TB II, sem medicação, tratados há pelo menos um ano e o grupo controle (Gráfico 20).

Gráfico 20. Atividade de iPLA₂ entre grupo controle, grupo TB sem tratamento e grupo de pacientes medicados há pelo menos um ano com ausência de sintomas psicóticos ($p = 0,02$)

5.2.4 Característica demográfica dos participantes

Tabela 3. Idade e sexo dos pacientes tratados há pelo menos um ano e seu respectivo grupo controle

	TB I (n = 47)	TB II (n = 25)	Controle (n = 49)	p
Idade (anos)	49 ± 15,5	45,8 ± 14,4	50,0 ± 16,8	0,869
Sexo feminino [n (%)]	27 (57,4)	19 (76,0)	29 (59,2)	0,265

Valores referentes a média ± desvio-padrão; TB: transtorno bipolar

Em relação à idade e sexo, não foram observadas diferenças entre os grupos.

A idade de início da doença foi (média ± desvio-padrão): 34,5 ± 14,4 anos para o TB I (n = 42) e 39,1 ± 10,2 anos para o TB II (n = 14). Não foram

observadas diferenças de início de idade entre o TB I e TB II ($p = 0,197$). Essa informação foi obtida por meio de pesquisa nos prontuários e em 23% destes não constava esta informação.

Em relação aos grupos controle, o grupo controle jovem é mais novo do que o grupo controle geral ($p < 0,001$ – teste *t-Student* para amostras independentes) e estes grupos não se diferiram quanto ao sexo ($p = 0,724$).

6 DISCUSSÃO

Investigamos duas amostras de pacientes. Pacientes não medicados (75% *drug naive*) e pacientes medicados por pelo menos um ano, como cada grupo de amostra tinham idades diferentes (idade média = $26,4 \pm 4,4$ anos e idade média = $50,0 \pm 16,8$ anos), convocamos dois grupos controles correspondentes quanto às distribuições de idade e sexo.

Na primeira amostra, entre os 20 pacientes sem medicação, 14 foram tratados de forma homogenia por seis semanas com carbonato de lítio, litemia sérica desses pacientes variou de 0,23 a 0,97 mEq/ L após as seis semanas. Antes e depois do tratamento a psicopatologia foi avaliada por HAM-D e YMRS, aplicadas por um psiquiatra experiente.

Na segunda amostra, foram recrutados pacientes em tratamento há pelo menos um ano, com diagnóstico de TB (sem comorbidade de SCH, AD, TOC, entre outros), utilizando mais de um medicamento: lítio (n = 51), valproato (n = 29), quetiapina (n = 12), topiramato (n = 4), sertralina (n = 4), clonazepam (n = 22), zolpiden (n = 5), lorax (n = 1), lamotrigina (n = 11), carbamazepina (n = 17), olanzapina (n = 10), haloperidol (n = 2), diazepam (n = 2), fluoxetina (n = 5) e risperidona (n = 3).

Este é o primeiro estudo em pacientes sem medicação e encontramos uma diminuição da atividade dos subtipos da PLA₂ e esta permaneceu quando consideramos os pacientes *drug naive*.

Em seu trabalho Hibbeln (1989) propôs um aumento da atividade da PLA₂ em pacientes bipolares, oque não foi confirmado neste estudo.

Ross et al. (2006) sugeriram que o aumento da iPLA₂ seja um marcador para o estado psicótico. Esta hipótese está em linha com nossos achados anteriores de um aumento da PLA₂ em pacientes com esquizofrenia e em pacientes com psicose associada à epilepsia do lobo temporal (Gattaz et al., 2011). Todavia esse achado não pode ser verificado em nossa amostra por tratar-se de pacientes com TB sem psicose (com exceção de dois pacientes que, como o resto do grupo tinham a atividade da PLA₂ menor que a media do grupo controle).

Adicionalmente não encontramos correlação entre atividade da PLA₂ e os escores da psicopatologia, sugerindo que a diminuição da PLA₂ encontrada em pacientes com TB não é um artefato de alterações biológicas secundárias a fenômenos como agitação, stress, insônia, alterações alimentares, etc (Kapczinski, 2004; Vieta et. al., 2011).

Vários estudos epidemiológicos mostraram que pacientes com TB, têm risco aumentado, cerca de cinco vezes para desenvolvimento de Doença de Alzheimer (DA) (Kessing, Nilson, 2003; Thompson et al., 2005;. Nunes et al, 2007). Em estudos anteriores encontramos evidências consistentes que uma redução da PLA₂ é um fator de risco significativo para DA. Esses dados sugerem que a diminuição da iPLA₂ em TB encontrada neste estudo poderia contribuir para o aumento do risco para DA nestes pacientes.

O lítio tem sabidamente um efeito neuroprotetor, de especial interesse é a capacidade do lítio em diminuir a GSK3B (Quiroz et al., 2004, 2010, Rapoport, 2009), que é importante na fosforilação da proteína TAU, um processo que contribui para a formação de emaranhados neurofibrilares encontrados na DA (Brion et al., 2001, Kwok et al., 2008, Forlenza et al., 2011). Além disso,

experimentos indicam que o lítio também participa na produção de B-amilóide, que é o componente principal das placas senis. Em estudos clínicos encontrou-se que o tratamento com lítio em pacientes com TB reduz o risco de estes pacientes desenvolverem a DA (Kessing, Nilson, 2003; Thompson et al., 2005; Nunes et al., 2007). Todavia no presente estudo não houve correlação entre o lítio e a atividade da PLA₂, sugerindo que essas enzimas não participam do efeito protetor do lítio contra a DA no TB. Todavia estes resultados negativos devem ser vistos com cautela, porque estudos *in vitro* mostram que a adição de lítio ao meio diminui a atividade da PLA₂ (Chang, Jones, 1998; Quiroz et al., 2010; Cheon et al., 2011). Adicionalmente não podemos descartar que o período de tratamento por seis semanas não tenha sido longo suficiente para sugerir mudança na expressão e ativação das PLA₂.

Os pacientes em tratamento com estabilizador do humor, não mostraram diferenças na atividade da PLA₂ quando comparado ao grupo controle. Não houve diferenças quando analisamos os grupos com TB I e II separadamente. Este achado deve ser visto com cuidado em face da heterogeneidade dos medicamentos utilizados nestas amostras de pacientes. Diversos estudos têm demonstrado a influência destas drogas sobre a atividade de PLA₂. Estudos mostraram que o valproato inibe o metabolismo de ácidos graxos, independente da inibição da PLA₂ em neurônios (Chang et al 2001 e Bosetti et al 2003). Todavia não foram descritos efeitos da carbamazepina sobre a atividade da iPLA₂ (Farooqui et al 2006). Diversos estudos descreveram uma redução da atividade da PLA₂ (Trzeciak et al, 1995, Gattaz, et al 1987, Tavares et al, 2003, Schmitt 2001) e também da inibição da iPLA₂ após a administração de antipsicóticos (Smesny et al., 2005, 2010). Estudos futuros poderiam

verificar se o tratamento crônico com estabilizadores do humor poderia compensar a diminuição da iPLA₂ observada em pacientes *drug naïve* com TB.

Neste estudo, não observamos nenhum efeito da idade sobre a iPLA₂, enquanto que a atividade da sPLA₂ e cPLA₂ estão diminuídas no grupo controles idosos quando comparados com o grupo controle geral. A sPLA₂ e a cPLA₂ têm grande envolvimento em processos inflamatórios, e o envelhecimento leva a um aumento dos níveis circulatórios de componentes relacionados a processos inflamatórios do sangue como por exemplo fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucinas e proteínas de fase aguda (Cartier et al., 2009; Leistad et al., 2011). Estes achados conflitam com a correlação negativa que encontramos entre estas enzimas e a idade.

Finalizando, pudemos realizar a análise inédita de pacientes TB sem uso de medicação, que nos permitiu analisar a atividade dos subtipos PLA₂ na fase inicial do TB. Nosso achado principal sugere que a diminuição da atividade dessas enzimas no estágio inicial do transtorno bipolar, além de alterar o remodelamento da membrana, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de demência nestes pacientes.

7 CONCLUSÃO

Nas plaquetas de pacientes TB II sem tratamento, as atividades da iPLA₂, sPLA₂ e cPLA₂ apresentaram-se diminuídas em relação ao grupo controle.

Após seis semanas de tratamento, o lítio não interferiu nas atividades de nenhum subtipo da PLA₂ avaliado (sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂).

A idade parece não interferir na atividade da iPLA₂.

Sugerimos que a idade interfere nas atividades da sPLA₂ e cPLA₂: quanto mais jovem, maior é a atividade destas enzimas.

A atividade da iPLA₂ está diminuída nas plaquetas de pacientes com transtorno bipolar sem tratamento medicamentoso em relação ao grupo de pacientes que estavam em tratamento há pelo menos um ano e também em relação ao grupo controle.

As atividades iPLA₂, sPLA₂ e cPLA₂ não apresentaram alterações significativas nos grupos de pacientes (TB I / II) tratados há pelo menos um ano quando comparados ao grupo controle.

8 REFERÊNCIAS

- APA. Associação Psiquiátrica Americana. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DMS-IV-TR. 4ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- Barradas MA, Mikhailidis DP. Serotonin, histamine and platelets in vascular disease with special reference to peripheral vascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25(11): 1063-76. Review.
- Basselin M, Villacreses NE, Lee HJ, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium administration attenuates up-regulated brain arachidonic acid metabolism in a rat model of neuroinflammation. *J Neurochem.* 2007; 102(3): 761–772.
- Blumberg HP, Krystal JH, Bansal R, Martin A, Dziura J, Durkin K, Martin L, Gerard E, Charney DS, Peterson BS. Age, rapid-cycling, and pharmacotherapy effects on ventral prefrontal cortex in bipolar disorder: a cross-sectional study. *Biol Psychiatry.* 2006 Apr 1; 59(7): 611-8
- Bosetti F, Weerasinghe GR, Rosenberger TA, Rapoport SI. Valproic acid down-regulates the conversion of arachidonic acid to eicosanoids via cyclooxygenase-1 and -2 in rat brain, *Journal of Neurochem* 2003; 85 (3) 690–696.
- Brion JP, Anderton BH, Authalet M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, Octave JN, Pradier L, Touchet N, Tremp G. Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Biochem Soc Symp.* 2001; (67): 81-8.
- Bush AI, Tanzi RE. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid β precursor protein isoforms in the platelet. *Arch Neurol* 1998; 55: 1179-1180
- Cartier A, Côté M, Lemieux I, Pérusse L, Tremblay A, Bouchard C, Després JP. Age-related differences in inflammatory markers in men: contribution of visceral adiposity. *Metabolism.* 2009 Oct; 58(10):1452-8
- Chalbot S, Zetterberg H, Blennow K, Fladby T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Cerebrospinal Fluid Secretory Ca^{2+} -Dependent Phospholipase A2 Activity Is Increased in Alzheimer Disease. *Clin Chem.* 2009; 55: 2171-9.
- Chang MC, Contreras MA, Rosenberger TA, Rintala JJ, Bell JM, Rapoport SI. Chronic valproate treatment decreases the in vivo turnover of arachidonic acid in brain phospholipids: a possible common effect of mood stabilizers *Journal of Neurochem,* 2001; 77 796–803.

- Chang MC, Jones CR. Chronic lithium treatment decreases brain phospholipase A2 activity. *Neurochem Res* 1998; 23(6): 887-92
- Cheon Y, Park JY, Modi HR, Kim HW, Lee HJ, Chang L, Rao JS, Rapoport SI., Chronic olanzapine treatment decreases arachidonic acid turnover and prostaglandin E2 concentration in rat brain. *J Neurochem*. 2011; 119: 364-76.
- Compton MT, Nemeroff CB. The Treatment of Bipolar Depression. *J Clin Psychiatry*. 2000; 61: 57-67.
- Correll CU. Assessing and maximizing the safety and tolerability of antipsychotics used in the treatment of children and adolescents. *J Clin Psychiatry*. 2008; 69 Suppl 4: 26-36. Review
- Dawson E, Gill M, Curtis D, Castle D, Hunt N, Murray R, Powell J, Genetic association between alleles of pancreatic phospholipase A2 gene and bipolar affective disorder. *Psychiatr Genet* 1995; 5 (4): 177-80
- Defilippo PP. *Atividade enzimática de subtipos de fosfolipase A₂ (PLA₂) em cultura primária de neurônios*. Dissertação (Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009. 109p.
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*. 2011; 111(10): 6130-85.
- Dennis EA. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci*. 1997; 22(1): 1-2.
- Devlin TM. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas*. São Paulo: Blucher, 7ª ed., 2011.
- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. 4a ed. *New York: Wiley-Liss*; 1997.
- Dikeos DG, Papadimitriou GN, Souery D, Del-Faver J, Massat I, Blackwood D, Cichon S, Daskalopoulou E, Ivezic S, Kaneva R, Karadima G, Lorenzi C, Milanova V, Muir V, Nothen M, Oruc L, Rietschel M, Serretti A, Van Broeckhoven C, Soldatos CR, Stefanis CN, Mendlewicz J, Lack of genetic association between the phospholipase A2 gene and bipolar mood disorder in a European multicenter case-control study. *Psychiatr Genet* 2006; 16 (4): 169-71.
- di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F. Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *Eur J Pharmacol*. 2000; 405: 277-83.

- Duffy A. The early natural history of bipolar disorder: what we have learned from longitudinal high-risk research. *Can J Psychiatry*. 2010 Aug; 55(8): 477-85
- Duffy A. The early course of bipolar disorder in youth at familial risk. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2009 Aug; 18(3): 200-5.
- Eckert GP, Schaeffer EL, Schmitt A, Maras A, Gattaz WF. Increased brain membrane fluidity in schizophrenia. *Pharmacopsychiatry*. 2011; 44: 161-2.
- Eckert GP, Cairns NJ, Maras A, Gattaz WF, Muller WE. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2000; 11(4): 181-6.
- Faedda GI, Baldessarini RJ, Glover IP, Austin NB. Pediatric bipolar disorder: phenomenology and course of illness. *Bipolar Disord*. 2004; 6: 305-13.
- Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders, *Pharmacol Review* 2006; 58: 591–620.
- Fenton, WS, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty Acids, Lipid Membrane Abnormalities, and the Diagnosis and Treatment of Schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000; 47: 8-21
- Flesch I, Schmidt B, Ferber E. Acyl Chain specificity and Kinetic properties of phospholipase A1 and A2 of bone E marrow-derived macrophages. *Z Naturforsch [C]* 1985, 40: 356-363. *Brain Res Bull*. 1999 Jun; 49(3): 139-53
- Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HP, Diniz BS, Gattaz WF. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2011; Feb;45(2):220-4.
- Forlenza OV, Mendes CT, Marie SK, Gattaz WF. Inhibition of phospholipase A2 reduces neurite outgrowth and neuronal viability. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007; 76: 47-55.
- Frey BN, Fonseca MMR, Machado-Vieira R, Soares JC, Kapczinski F. Anormalidades neuropatológicas e neuroquímicas no transtorno afetivo bipolar. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004; 26; 180-8.
- Fu-I L. Transtorno afetivo bipolar na infância e na adolescência. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004; 26(Supl III): 22-6.
- Gattaz WF, Valente KD, Raposo NR, Vincentiis S, Talib LL. Increased PLA(2) activity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and psychosis. *J Psychiatr Res*. 2011; 45 (12): 1617-20.

- Gattaz WF. Neuroquímica da esquizofrenia: papel dos fosfolípidos. *Rev Bras Psiquiatr.* 2000; 22: 5-8.
- Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Förstl H, Braus DF, Maras A. Decreased phospholipase A₂ activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1996; 246: 129-31.
- Gattaz WF, Schmitt A, Maras A. Increased platelet phospholipase A₂ activity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 1995a; 16: 1-6.
- Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Förstl H. Decreased phospholipase A₂ activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry.* 1995b; 37: 13-17.
- Gattaz WF, Hübner C v K, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ. Increased serum phospholipase A₂ activity in schizophrenia: a replication study. *Biol Psychiatry.* 1990; 28: 495-501.
- Gattaz WF, Kollisch M, Thuren T, Virtanen JA, Kunnunen PKJ. Increased plasma phospholipase A₂ activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biol Psychiatry.* 1987; 22: 421-6.
- Gould TD, Manji HK. The Wnt Signaling Pathway in Bipolar Disorder. *Neuroscientist* 2002; 8: 497–511.
- Green JT, Orr SK, Bazinet RP. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A₂ in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. *J Lipid Res.* 2008;49 (5):939-44. Review
- Gresele P, Page CP, Fuster V, Vermeylen J. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders, Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics.* Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2010.
- Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; 23: 56-62.
- Hibbeln JR, Palmer JW, Davis JM. Are disturbances in lipid-protein interactions by phospholipase-A₂ a predisposing factor in affective illness? *Biol Psychiatry* 1989; 25: 945-61.
- Horrobin DF, Bennett CN. New gene targets related to schizophrenia and other psychiatric disorders: enzymes, binding proteins and transport proteins involved in phospholipid and fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999a; 60: 141-67.
- Horrobin DF, Bennett CN. Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acid and phospholipid metabolism and to diabetes, cardiovascular disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis. *Prostaglandins Leuk Essent Fatty Acids* 1999b; 60(4): 217-34.

Horrobin DF, Glen AIM, Vaddadi K The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Res*. 1994; 13: 195-207.

Kapczinski F, Frey BN, Zannatto V. Fisiopatologia do transtorno afetivo bipolar: o que mudou nos últimos 10 anos? *Rev Bras Psiquiatr*. 2004; 26(Supl III): 17-21

Kessing LV, Forman JL, Andersen PK. Does lithium protect against dementia? *Bipolar Disord*. 2010; 12: 87-94.

Kessing LV, Andersen PK. Does the risk of developing dementia increase with the number of episodes in patients with depressive disorder and in patients with bipolar disorder? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75(12): 1662-1666.

Kessing LV, Nilsson FM. Increased risk of developing dementia in patients with major affective disorders compared to patients with other medical illnesses. *J Affect Disord*. 2003; 73 (3): 261-9.

Kim HW, Rapoport SI, Rao JS. Altered arachidonic acid cascade enzymes in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Mol Psychiatry*. 2011; 16, 419–428.

Kudo I, Murakami M. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; 68-69: 3-58.

Kwok JB, Loy CT, Hamilton G, Lau E, Hallupp M, Williams J, Owen MJ, Broe GA, Tang N, Lam L, Powell JF, Lovestone S, Schofield PR. Glycogen synthase kinase-3beta and tau genes interact in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2008; Oct; 64(4): 446-54.

Lee LY, Ong WY, Farooqui AA, Burgunder JM. Role of calcium-independent phospholipase A₂ in cortex striatum thalamus cortex circuitry-enzyme inhibition causes vacuous chewing movements in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 Dec; 195(3): 387-95.

Leistad L., Feuerherm AJ, Faxvaag A, Johansen B. Multiple phospholipase A₂ enzymes participate in the inflammatory process in osteoarthritic cartilage. *Scand J Rheumatol*. 2011; 40(4): 308-16

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265–275.

MacDonald DJ, Boyle RM, Glen ACA, Ross BM, Glen AIM, Ward PE, McKinney SB, Peterkin MA. The investigation of phospholipase A₂ using ELISA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004; 70: 377-81.

Machado-Vieira R, Schwartzhaupt W A, Noronha Frey BN, Lenadro JJ, Ceresér KMM, Silveira LN, Zanatta LM, Garcia PF, Pollet P, Braga VF, Ceresér Jr VH,

- Gauer G. Neurobiologia do transtorno de humor bipolar e tomada de decisão na abordagem psicofarmacológica. *R PsiquiatrRS* 2003; 25 : 88-105.
- Meira-Lima I, Jardim D, Junqueira R, Ikenaga E, Vallada H. Allelic association study between phospholipase A2 genes and bipolar affective disorder. *Bipolar Disord* 2003; 5: 295–299.
- Montgomery SA, Schatzberg AF, Guelfi JD, Kasper S, Nemeroff C, Swann A, Zaiecka J. Pharmacotherapy of Depression and Mixed States in Bipolar Disorder. *J Affect Disord*. 2000; 59: S39-S56.
- Moorhead TW, McKirdy J, Sussmann JE, Hall J, Lawrie SM, Johnstone EC, McIntosh AM. Progressive gray matter loss in patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Oct 15;62(8):894-900.
- Moreno RA, Moreno DH, Soares MBM, Ratzke R. Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar *Rev Bras Psiquiatr*. 2004; 26: 37-43.
- Murakami M, Kudo I. Phospholipase A₂. *J Biochem*. 2002; 131, 285-292
- Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 5ª ed., 2011.
- Noponen M, Sanfilipo M, Samanich K, Ryer H, Ko G, Angrist B, et al. Elevated PLA₂ activity in schizophrenics and other psychiatric patients. *Biol Psychiatry*. 1993; 34: 641-9.
- Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 2007; 190: 359-60.
- Nunes PV, Wacker P, Forlenza OV, Gattaz WF. O uso do lítio em idoso: evidências de sua ação neuroprotetora. *Rev Psiq Cli*. 2002; 29 (5): 248-255.
- Oliveira JL, Silva JR GB, Abreu KLS, Rocha NA, Franco LFLG, Araújo SMHA, Daher EF* - 2010 - Nefrotoxicidade por Lítio. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(5): 600-6.
- Organização Mundial da Saúde. *Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 1993.
- Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1997-2004.
- Pereira LL, Dias ACG, Caeran J, Collares LA, Penteado RV. Transtorno Bipolar: Reflexões sobre diagnóstico e tratamento. *Erechim* 2010; 34: 151-166.

Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem.* 1979; 100(2): 201-20.

Post RM, Leverich GS, Kupka RW, Keck PE Jr, McElroy SL, Altshuler LL, Frye MA, Luckenbaugh DA, Rowe M, Grunze H, Suppes T, Nolen WA. Early-onset bipolar disorder and treatment delay are risk factors for poor outcome in adulthood. *J Clin Psychiatry.* 2010 Jul; 71(7): 864-72.

Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate Jr CA, Manji HK. Novel Insights into Lithium's Mechanism of Action: Neurotrophic and Neuroprotective Effects. *Neuropsychobiology* 2010; 62: 50-60.

Quiroz JA, Gould TD, and Manji HK Molecular effects of lithium. *Mol Interv* 2004; 4: 259–272.

Rao JS, Ertley RN, Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. Chronic NMDA administration to rats upregulates frontal cortex cytosolic phospholipase A2 and its transcription factor, activator protein-2. *J Neurochem.* 2007; 102(6):1918–1927.

Rao JS and Rapoport SI Mood-stabilizers target the brain arachidonic acid cascade. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2:207–214

Rapoport SI, Basselin M, Kim HW, Rao JS. Bipolar disorder and mechanisms of action of mood stabilizers. *Brain Res Rev.* 2009 Oct; 61(2): 185-209. Review.

Rapoport SI, Bosetti F. Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder? *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59: 592-6.

Rintala J, Seemann R, Chandrasekaran K, Rosenberger TA, Chang L, Contreras MA, Contreras MA, Rapoport SI, Chang MC. 85 kDa cytosolic phospholipase A2 is a target for chronic lithium in rat brain. *Neuroreport.* 1999 16; 10(18): 3887-90.

Ross BM, Hughes B, Kish, SJ, Warsh. JJ. Serum calcium-independent phospholipase A2 activity in bipolar affective disorder. *Bipolar Disord* 2006; 8: 265–270.

Ross BM, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. Differential alteration of phospholipase A₂ activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Res.* 1999; 821: 407-413.

Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity. *J Neurochem.* 1998;70 (2): 786-93.

- Sansone RA, Sansone LA. Managing bipolar disorder in the primary care setting: a perspective for mental health professionals. *Innov Clin Neurosci*. 2011; 8(10): 10-13.
- Schaloske RH, Dennis EA: The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1761(11): 1246-59.
- Schaeffer EL, da Silva ER, Novaes Bde A, Skaf HD, Gattaz WF. Differential roles of phospholipases A2 in neuronal death and neurogenesis: implications for Alzheimer disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 1;34 (8): 1381-9.
- Schaeffer EL, Forlenza OV, Gattaz WF. Phospholipase A2 activation as a therapeutic approach for cognitive enhancement in early-stage Alzheimer disease. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 202(1-3): 37-51.
- Schaeffer EL. *A inibição da atividade da fosfolipase A₂ no hipocampo de ratos prejudica a formação da memória de curta e de longa duração: implicações para a doença de Alzheimer* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 167p.
- Schmitt A, Maras A, Petroianu G., Braus DF, Scheuer L, Gattaz W.F. Effects of antipsychotic treatment on membrane phospholipid metabolism in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission* 2001 108: 1081–1091.
- Shulman KI, Herrmann N. The nature and management of mania in old age. *Psychiat. Clin. North Am*. 1999; 22:649-65.
- Smesny S, Milleit B, Nenadic I, Preul C, Kinder D, Lasch J. Phospholipase A2 activity is associated with structural brain changes in schizophrenia, *Neuroimage* 52 (2010) 1314–1327.
- Smesny S, Stein S, Willhardt I, Lasch J, Sauer H. Decreased phospholipase A2 activity in cerebrospinal fluid of patients with dementia. *J Neural Transm*. 2008 Aug; 115(8): 1173-9.
- Smesny S, Kinder D, Wilhardt I, Rosburg T, Lasch J, Berger G, Sauer H. Increased calcium-independent phospholipase A₂ activity in first but not in multiepisode chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2005; 57: 399-405.
- Soares JC, Kochunov P, Monkul ES, Nicoletti MA, Brambilla P, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Lancaster J, Fox P. Structural brain changes in bipolar disorder using deformation field morphometry. *Neuroreport*. 2005 Apr 25; 16(6): 541-4.
- Spiegelberg BD, Cruz J, Law TH, John York JD. Alteration of Lithium Pharmacology through Manipulation of Phosphoadenosine Phosphate Metabolism. *J Biol Chem*. 2005; 280: 5400–5405.

- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res.* 2004; 45 (2): 205-13.
- Suppes, T.; Dennehy, E. B. Transtorno Bipolar. Tradução Marina Fodra. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- Talib LL, Diniz BS, Zainaghi IA, Forlenza OV, Gattaz WF, A radioenzymatic assay to identify three groups of phospholipase A (2) in platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2012; 86 (4-5): 149-53.
- Talib LL, Yassuda MS, Diniz BS, Forlenza OV, Gattaz WF. Cognitive training increases platelet PLA2 activity in healthy elderly subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008; 78 (4-5): 265-9.
- Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. Increased phospholipase A₂ activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophr Res.* 2003; 61: 1-6.
- Thompson JM, Gallacher P, Hughes JH, Watson S, Gray JM, Ferrier IN, Young AH. Neurocognitive impairment in euthymic patients with bipolar affective disorder. *Br J Psychiatry* 2005; 186: 32-40.
- Trzeciak HI, Kalacinski W, Malecki A, Kokot D. Effect of neuroleptics on phospholipase A2 activity in the brain of rats. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 1995; 245: 179–182.
- Vieta E, Reinares M, Rosa AR. Staging Bipolar Disorder. *Neurotox Res* 2011; 19: 279-285.
- Weerasinghe GR, Rapoport SI, Bosetti F. The effect of chronic lithium on arachidonic acid release and metabolism in rat brain does not involve secretory phospholipase A₂ or lipoxygenase/cytochrome P450 pathways. *Brain Res Bull* 2004; 63: 485-489.
- Yao JF, Leonard S, Reddy R. Membrane phospholipid abnormalities in post mortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 2000; 42: 7-17.
- Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry* 1978; 133: 429-35.

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo I

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Coleta de Sangue
(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

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 (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA – Metabolismo de fosfolípidos em doenças neuropsiquiátricas.

PESQUISADOR: Wagner F. Gattaz

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular/Psiquiatra INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 25.956

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto e Departamento de Psiquiatria – Laboratório de Neurociências.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Quatro anos

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

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa** - Investigações internacionais realizadas na última década têm relatado alterações biológicas em pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos. Dentre estas foram detectadas alterações em genes e alterações bioquímicas possivelmente relacionadas com o risco para a doença. O presente estudo tem como objetivo investigar tais alterações em indivíduos portadores de doenças neuropsiquiátricas. Como grupo comparativo faremos as mesmas avaliações em indivíduos saudáveis. Esse estudo será realizado no Laboratório de Neurociências (LIM-27) no Depto de Psiquiatria da FMUSP.

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

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

4. **benefícios que poderão ser obtidos** - Não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a existência de variantes genéticas e bioquímicas associadas a diversas doenças neuropsiquiátricas. É possível, mas não garantido, que os pacientes com algumas destas doenças possam beneficiar-se dos resultados deste estudo no futuro, bem como seus familiares. O nosso estudo visa um maior esclarecimento dos mecanismos biológicos responsáveis pelo aparecimento das doenças. De posse destes conhecimentos, espera-se conseguir no futuro melhores estratégias para o tratamento e prevenção das referidas doenças.

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

1. **acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.** - Você pode perguntar sobre qualquer dúvida que tenha agora ou a qualquer momento durante o estudo e poderá ter acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência - Você pode recusar-se a participar e pode retirar o consentimento e descontinuar sua participação a qualquer momento, sem que haja qualquer punição ou perda de benefício aos quais tinha direito. O médico responsável pelo seu tratamento não pertence à equipe que executa esta pesquisa. Portanto ele pode, sempre que julgar necessário, e a qualquer momento, retirá-lo do estudo sem que isto venha a prejudicar o seu tratamento e a assistência que você vem recebendo.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade - Os registros que identificarem você pelo seu nome serão mantidos confidenciais e nenhum documento que o identifique sairá do hospital. Se os resultados deste estudo forem publicados, sua identidade permanecerá absolutamente confidencial.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa - Como esclarecido acima, os riscos relacionados a esta pesquisa são mínimos, unicamente envolvendo a punção venosa para a coleta de sangue. Todavia garantimos a disponibilidade de assistência no HCFMUSP para cobrir qualquer dano à saúde, por menor que seja, diretamente decorrente desta pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa - Vide item 4.

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

Dr. Wagner F Gattaz - Instituto de Psiquiatria, HCFMUSP - 3062.9029. email: gattaz@usp.br. BIP - 6847.5000 (código GA123).

Dr. Orestes Forlenza - Instituto de Psiquiatria, HCFMUSP - 3069.7267. email: forlenza@usp.br

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, e consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Apêndice B – Aprovação do projeto de pesquisa CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/04/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0100/10**, intitulado: **"ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE A2 NO TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR"** apresentado pelo Departamento de **PSIQUIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz**

Pesquisador (a) Executante: **Eliza Hiromi Ikenaga**

Recbido: 17/04/10, às 16h22
Assinatura de: [assinatura]

CAPPesq, 08 de Abril de 2010

[assinatura]

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

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

Apêndice C – Escala de Hamilton para avaliação de depressão (HAM-D)

Todos os itens devem ser preenchidos. Assinalar o número que melhor caracterize o paciente na última semana

1. Humor deprimido (tristeza, desesperança, desemparo, inutilidade)

- 0 – Ausente
- 1 – Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido
- 2 – Sentimentos relatados espontaneamente com palavras
- 3 – Comunica os sentimentos não só com palavras, isto é, com a expressão facial, postura, voz e tendência ao choro
- 4 – Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não-verbal do paciente.

2. Sentimentos de culpa

- 0 – Ausente
- 1 – Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros
- 2 – Ideias de culpa ou ruminação sobre erros passados ou más ações
- 3 – A doença atual é um castigo
- 4 – Escuta vozes de acusação ou denúncia e/ ou tem alucinações visuais ameaçadoras

3. Suicídio

- 0 – Ausente
- 1 – Sente que a vida não vale a pena
- 2 – Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte
- 3 – Ideias ou gestos suicidas
- 4 – Tentativa de suicídio

4. Insônia inicial

- 0 – Sem dificuldades para conciliar o sono
- 1 – Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora
- 2 – Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites

5. Insônia intermediária

- 0 – Sem dificuldades
- 1 – O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite
- 2 – Acorda a noite – qualquer saída da cama marcar 2 (exceto para urinar)

6. Insônia tardia

- 0 – Sem dificuldades
- 1 – Acorda de madrugada, mas volta a dormir
- 2 – Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama

7. Trabalho e atividades

- 0 – Sem dificuldades
- 1 – Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades, trabalho ou passatempos
- 2 – Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade)

3 – Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempo)

4 – Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou se for incapaz de realiza-las sem ajuda.

8. Retardo (lentidão de ideias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)

0 – Pensamento e fala normais

1 – Leve retardo à entrevista

2 – Retardo óbvio à entrevista

3 – Entrevista difícil

4 – Estupor completo

9. Agitação

0 – Nenhuma

1 – Inquietude

2 – Brinca com as mãos, com os cabelos, etc

3 – Mexe-se, não consegue sentar quieto

4 – Torce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios

10. Ansiedade psíquica

0 – Sem dificuldade

1 – Tensão e irritabilidade subjetivas

2 – Preocupação com trivialidades

3 – Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala

4 – Medos expressos sem serem inquiridos

11. Ansiedade somática (concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como: Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructação; Cardiovasculares: palpitações, cefaleia; Respiratórios: hiperventilação, suspiros, sudorese; ter que urinar frequentemente)

0 – Ausente

1 – Leve

2 – Moderada

3 – Grave

4 – Incapacitante

12. Sintomas somáticos gastrointestinais

0 – Nenhum

1 – Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdômen

2 – Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos

13. Sintomas somáticos em geral

0 – Nenhum

1 – Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaleia, mialgias. Perda de energia e cansaço

2 – Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2

14. Sintomas genitais (tais como perda da libido, distúrbios menstruais)

- 0 – Ausentes
- 1 – Leves
- 2 – Intensos

15. Hipocondria

- 0 – Ausente
- 1 – Auto-observação aumentada (com relação ao corpo)
- 2 – Preocupação com a saúde
- 3 – Queixas frequentes, pedidos de ajuda, etc
- 4 – Ideias delirantes hipocondríacas

16. Perda de peso (marcar A ou B)

A – Quando avaliada pela história clínica

- 0 – Sem perda de peso
- 1 – Provável perda de peso associada à moléstia atual
- 2 – Perda de peso definida (de acordo com o paciente)
- 3 – Não avaliada

B – Avaliada semanalmente pelo psiquiatra responsável, quando são medidas alterações reais de peso

- 0 – Menos de 0,5 kg de perda por semana
- 1 – Mais de 0,5 kg de perda por semana
- 2 – Mais de 1 kg de perda por semana
- 3 – Não avaliada

17. Crítica

- 0 – Reconhece que está deprimido e doente
- 1 – Reconhece a doença mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc.
- 2 – Nega estar doente.

Pontuação total da HAM-D de 17 itens: _____ (amplitude: 0 a 50 pontos)

Apêndice D – Escala de Young para avaliação de mania

Todos os itens devem ser preenchidos. Assinalar o número que melhor caracteriza o paciente na última semana.

1. Humor e afeto elevados

- 0 – Ausente
- 1 – Humor e afeto discreta ou possivelmente aumentados quando questionado
- 2 – Relato subjetivo de elevação clara do humor
- 3 – Afeto elevado ou inapropriado ao conteúdo do pensamento; jocoso
- 4 – Eufórico; riscos inadequados, cantando

2. Atividade motora – energias aumentadas

- 0 – Ausente
- 1 – Relato subjetivo de aumento de energia ou atividades motoras
- 2 – Apresenta-se animado ou com gestos aumentados
- 3 – Energia excessiva; às vezes, hiperativo; inquieto (mas pode ser acalmado)
- 4 – Excitação psicomotora; hiperatividade contínua (não pode ser acalmado)

3. Interesse sexual

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

4. Sono

- 0 – Não relata diminuição do sono
- 1 – Dorme menos que a quantidade normal, cerca de 1 hora a menos do que o habitual
- 2 – Dorme menos que a quantidade normal, mais de 1 hora a menos do que o habitual
- 3 – Relata diminuição da necessidade de sono
- 4 – Nega necessidade de sono

5. Irritabilidade

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

6. Fala (velocidade e quantidade)

- 0 – Sem aumento
- 2 – Percebe-se mais falante que o seu habitual
- 4 – Aumento da velocidade ou da quantidade da fala em alguns momentos; verborreico, às vezes, com solicitação, consegue-se interromper a fala
- 6 – Quantidade e velocidade constantemente aumentadas; dificuldade para ser interrompido (não atende as solicitações, fala junto com o entrevistador)

8 – Fala pressionada, ininterruptível, contínua (ignora a solicitação do entrevistador)

7. Linguagem – distúrbio do pensamento

0 – Sem alterações

1 – Circunstancial, pensamentos rápidos

2 – Perde objetivos do pensamento; muda de assunto frequentemente; pensamentos muito acelerados

3 – Fuga de ideias; tangencialidade; dificuldades para acompanhar o pensamento; ecolalia consoante

4 – Incoerência; comunicação impossível

8. Conteúdo

0 – Normal

2 – Novos interesses e planos compatíveis com a condição sociocultural do paciente, mas questionáveis

4 – Projetos especiais totalmente incompatíveis com a condição socioeconômica do paciente; hiper-religioso

6 – Ideias supervalorizadas

8 – Delírios

9. Comportamento disruptivo agressivo

0 – Ausente

2 – Sarcástico; barulhento; às vezes, desconfiado

4 – Ameaça o entrevistador, gritando; entrevista dificultada

6 – Agressivo; destrutivo; entrevista impossível

10. Aparência

0 – Arrumado e vestido apropriadamente

1 – Descuidado minimamente; adornos ou roupas minimamente inadequados ou exagerados

2 – Precariamente asseado; despenteado moderadamente; vestido com exagero

3 – Desgrenhado; vestido parcialmente; maquiagem extravagante

4 – Completamente descuidado; com muitos adornos e adereços; roupas bizarras

11. *Insight* (discernimento)

0 – *Insight* presente: espontaneamente refere estar doente e concorda com a necessidade de tratamento

1 – *Insight* duvidoso: com argumento admite possível doença e necessidade de tratamento

2 – *Insight* prejudicado: espontaneamente admite alteração comportamental, mas não relaciona com a doença ou discorda da necessidade de tratamento

3 – *Insight* ausente: com argumento admite de forma vaga alteração comportamental, mas não relaciona com a doença ou discorda da necessidade de tratamento

4 – *Insight* ausente: nega a doença, qualquer alteração comportamental e a necessidade de tratamento

Pontuação total da YMRS: _____ (amplitude: 0 a 60 pontos)