UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PSIQUIATRIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE DO FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) E SEU NÍVEL SÉRICO EM PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR

JULIANA FERNANDES TRAMONTINA

ORIENTADOR
PROF. DR. FLÁVIO PEREIRA KAPCZINSKI

FEVEREIRO/2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE DO FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) E SEU NÍVEL SÉRICO EM PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR

Juliana Fernandes Tramontina

Orientador
Prof. Dr. Flávio Pereira Kapczinski

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Fevereiro de 2007.

61
T771a Tramontina, Juliana Fernandes

A Associação entre o polimorfismo do gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seu nível sérico em pacientes com transtorno bipolar / Juliana Fernandes Tramontina. Porto Alegre, 2007.

67 f.: graf., tab.

Orientador: Flávio Pereira Kapczinski

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Psiquiatria, Porto Alegre, 2007.

1.Transtorno bipolar. 2. Polimorfismo genético. 3. Fator neurotrófico derivado do cérebro. I Kapczinski, Flávio Pereira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Psiquiatria. III. Título

CDU 61

(Bibliotecária responsável: Miriam Velci Barcellos Fernandes – 10/135)

Ao Sandro,
meu lar, pelo amor e paciência.

À minha família, em especial à minha mãe.

Agradecimentos

Ao professor Flávio Kapczinski pelo exemplo de dedicação, conhecimento e vibração com a pesquisa. A possibilidade de compartilhar seu convívio tornou minha formação clínica e acadêmica mais instigante e proveitosa.

A todos os colegas do Laboratório de Psiquiatria Experimental e do Programa de Atendimento de Transtorno do Humor Bipolar, em especial ao Benício Frey, Ana Cristina Andreazza e Keila Ceresér. Ao apoio da equipe do Laboratório de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, principalmente à professora Mara Hutz e Marília Zandoná.

À Márcia Sant'Anna pelo exemplo de competência e por ter me apresentado ao Professor Flávio Kapczinski.

A todos amigos, colegas e familiares que ao longo desta etapa me apoiaram e fizeram parte da minha formação profissional e pessoal.

Aos pacientes e voluntários que participaram do estudo, sem os quais esta pesquisa e minhas dúvidas científicas não teriam sentido.

SUMÁRIO

SUMÁRIO **6**
LISTA DE ABREVIATURAS **7**
LISTA DE FIGURAS **8**
RESUMO **9**
ABSTRACT **11**
1 INTRODUÇÃO **13**
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA **15**
2.1 A GENÉTICA DO TRANSTORNO BIPOLAR E O POLIMORFISMO DO GENE DO BDNF 15
2.2 O FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) 18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **24**
4 OBJETIVOS **30**
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL 30
4.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO 30
5 PROTEÇÃO DOS DIREITOS HUMANOS **31**
6 MÉTODOS **32**
6.1 ANÁLISE DE BDNF SÉRICO 33
6.2 ANÁLISE DO DNA 33
7 ARTIGO **35**
7.1 VERSÃO EM PORTUGUÊS 35
7.2 VERSÃO EM INGLÊS 41
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS **47**
ANEXO 1 ESCALAS **53**
ANEXO 2 PROTOCOLOS **56**
ANEXO 3 TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO **65**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
BDNF	do inglês, b*rain derived neurotrophic factor* - fator neurotrófico derivado do cérebro
$BDNF_{Met}$	presença de heterozigose para o alelo met do BDNF
DNA	do inglês, *deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribo nucléico
DSM-IV	do inglês, *diagnostic and statistical manual of mental disorders* - manual de diagnóstico e estatística de transtornos mentais, 4ª. ed
DZ	gêmeos dizigóticos
Met	do inglês, *methionine* - metionina
MZ	gêmeos monozigóticos
NGF	do inglês, *nerve growth factor* - fator de crescimento neural
NT	neurotrofina
HDRS	do inglês, *Hamilton depression rating scale* - escala de depressão de Hamilton
RER	retículo endoplasmático rugoso
TB	transtorno bipolar
Trk	do inglês, *tyrosine kinase receptor* - receptor tirosina cinase
SNP	do inglês, *single nucleotide polymorphism* - polimorfismo de nucleotídeo único
Val	valina
YMRS	do inglês, *Young mania rating scale* - escala de avaliação de mania de Young

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação teórica

Figura 1- Família das neurotrofinas e seus receptores específicos.....20

Artigo – Versão em Português

Figura1 - Níveis de BDNF sérico em relação ao polimorfismo do BDNF val66met em pacientes bipolares e controles.....39

Artigo – Versão em Inglês

Figure 1 - The results of serum BDNF levels and val66met polymorphism of BDNF gene in bipolar and control subjects……..44

Considerações Finais

Tabela 1. Freqüência do sexo feminino, média da idade, média da pontuação das escalas de depressão (HDRS)/mania (YMRS) e média do nível sérico de BDNF em 114 pacientes bipolares e 137 controles.....50

Tabela 2. Freqüência do genótipo e dos alelos do SNP val66met do BDNF em 114 pacientes bipolares e 137 controles.....50

Figura1 - Níveis de BDNF sérico em relação ao polimorfismo do BDNF val66met em pacientes bipolares e controles.....51

Figura 2- Possível influência do $BDNF_{Met}$ nos níveis séricos de BDNF.....52

RESUMO

Introdução

Existem fortes evidências de um fator genético estar envolvido na etiologia do transtorno bipolar (TB), contudo a interação entre polimorfismos genéticos e alterações bioquímicas permanecem desconhecidas. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) parece exercer um papel importante na patofisiologia do TB.

Objetivos

O presente estudo tem por objetivo avaliar a associação do polimorfismo localizado no gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e os níveis séricos desta substância em pacientes com transtorno bipolar.

Material e Métodos

Foram selecionados 114 pacientes com TB tipo I de acordo com critério do DSM-IV e 137 controles pareados por sexo, idade e anos de estudo para a análise do polimorfismo val66met do BDNF e do BDNF sérico. Suas associações foram medidas através da análise de variância (ANOVA).

Resultados

Não houve diferenças significativas na freqüência dos genótipos do polimorfismo val66met do BDNF entre pacientes e controles ($p>0.05$; teste Qui-quadrado). Não foi encontrada associação entre o polimorfismo do gene do BDNF e o diagnóstico

de transtorno bipolar(eutímicos) nos níveis séricos de BDNF (p=0.34; ANOVA Fatorial)

Conclusão

O polimorfismo do BDNF val66met parece não interferir no nível sérico de BDNF em pacientes bipolares em tratamento e controles sem TB, sugerindo que a variante $BDNF_{Met}$ não diminui a secreção constitutiva; possivelmente este polimorfismo do BDNF exerça alguma influencia nos níveis séricos do BDNF durante os episódios agudos da doença.

Palavras-chave: transtorno bipolar, fator neurotrófico derivado do cérebro, polimorfismo genético.

ABSTRACT

Introduction

There is strong evidence demonstrating that genetic inheritance is associated with higher susceptibility to bipolar disorder (BD) but the interaction between gene polymorphisms and biochemical changes remains largely unknown. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) may play a role in the pathophysiology of BD.

Objectives

The aim of the present study was to evaluate the association between BDNF polymorphism val66met and its serum levels in bipolar patients.

Methods

One hundred and seven Caucasian type-I bipolar patients were recruited from the Bipolar Disorders Program and underwent Structured Clinical Interview for DSM-IV-Axis I for diagnosis. The subjects were matched by age, gender and education with137 controls without BD. The association between BDNF serum levels and polymorphism was analysed by ANOVA.

Results

No significant differences were found in the frequency of the BDNF val66met genotype or allele distribution between patients and controls ($p>0.05$; Chi-square test). We have found no significant interaction between BDNF polymorphism and

diagnostic status (bipolar disorder and controls) on serum BDNF levels (p=0.34; Factorial ANOVA)

Conclusion

BDNF val66met polymorphism does not affect serum BDNF levels in a sample of mostly euthymic BD subjects currently on medication. Considering that the $BDNF_{Met}$ variant decreases only the activity-dependent but not the constitutive BDNF secretion, it is conceivable that BDNF polymorphism may exert some influence on serum BDNF levels during acute mood episodes.

Key-words: bipolar disorder, brain-derived neurotrophic factor, genetic polymorphism

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno do humor grave, crônico, recorrente e com aumento progressivo da gravidade dos episódios, afetando igualmente homens e mulheres, com início de sua sintomatologia entre 15-30 anos de idade. É caracterizado por episódios recorrentes de mania e depressão, podendo ser subdividido em duas entidades diagnósticas: TB tipo I (episódios depressivos maiores recorrentes com episódios maníacos) e TB tipo II (episódios depressivos maiores recorrentes com episódios hipomaníacos). Ambos apresentam sintomas que envolvem alterações no humor, cognição e comportamento. A intensidade dos sintomas é variável, acarretando prejuízos no desempenho das atividades diárias e em sofrimento pessoal (1, 2, 3, 4).

A base fundamental do THB é seu caráter cíclico, pois normalmente um episódio maníaco ou hipomaníaco promove um novo episódio no futuro. Além das altas taxas de recorrência (50-90%), a persistência dos sintomas é outra característica desta patologia, pois apesar do tratamento farmacológico, os pacientes podem apresentar sintomas durante metade das suas vidas (5).

Um estudo multicêntrico realizado no Brasil em 1992, estima a prevalência de 0,7% da população de Porto Alegre/RS portadora de TB; entretanto, quando são também consideradas formas mais leves desse transtorno (o assim chamado espectro bipolar), estudos indicam uma prevalência de até 3 a 6% na população em geral (6, 7).

A causa precisa do TB não foi estabelecida. Sabe-se que múltiplos fatores podem estar envolvidos (genéticos, bioquímicos, psicodinâmicos e sócio-ambientais) (7).

Estudos de famílias, gêmeos e adoção mostraram forte evidência de um componente genético para a etiologia do TB (8, 9).

Sabe-se que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) possui um papel relevante na patofisiologia dos transtornos de humor. Este fator neurotrófico protege o cérebro de dano neuronal e parece afetar a neurogênese no hipocampo, o qual está envolvido na patogênese dos transtornos de humor. Dessa forma, o gene do BDNF é um forte candidato que provavelmente deve causar susceptibilidade ao TB ou influenciar no fenótipo clínico da doença (9, 10).

Estudos que permitam uma melhor especificação do TB poderiam contribuir para um melhor entendimento desta psicopatologia. Além disso, acredita-se que a descoberta de alterações genéticas no TB possa auxiliar em uma terapêutica mais eficaz no futuro.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A genética do transtorno bipolar e o polimorfismo do gene do BDNF

Diversas características de padrão de herança familiar do TB indicam um envolvimento de genes que conferem suscetibilidade a este transtorno. Na prática clínica observa-se que o TB geralmente ocorre em famílias e com um modo de herança complexo, não seguindo simplesmente o padrão de herança Mendeliana, mas provavelmente uma herança multifatorial poligênica. Ocasionalmente algumas famílias podem ser afetadas com um único gene que confere suscetibilidade, contudo a maioria dos indivíduos com transtorno bipolar apresenta um transtorno com transmissão genética mais complexa, como a interação de múltiplos genes e ambiente. Estas observações clínicas foram confirmadas em estudos genéticos que indicaram um aumento significativo do risco de TB ao longo da vida em parentes de primeiro grau de probandos bipolares. Estes resultados variam, de acordo com a metodologia do estudo, entre um risco de 5 a 10 vezes maior que o da população em geral (11, 12).

Estudos com gêmeos também demonstram uma maior concordância do TB em gêmeos monozigóticos (MZ) em comparação com gêmeos dizigóticos (DZ) (11, 12, 13).

Bertelsen *et al* (*apud* 12, 13) primeiramente investigaram 123 pares de gêmeos e observaram que probandos bipolares tinham uma concordância para TB de 62% para MZ e de 8% para DZ. Além disso, o TB é mais comum em pais

biológicos de crianças bipolares adotadas em comparação com pais adotivos (*apud* 12, 13).

Dado que estudos de famílias, gêmeos e adoção não são suficientes para a identificação de um gene específico de vulnerabilidade, estudos de ligação e associação são realizados para elucidação de bases genéticas mais específicas do TB.

Os estudos de ligação avaliam a localização de genes vulneráveis através da análise de fragmentos de cromossomos que são herdados juntamente com a doença. Estes estudos no TB inicialmente mostraram resultados promissores, mas que não se confirmaram posteriormente. A variedade de *loci* potencialmente relacionados ao TB reflete em parte a heterogeneidade fenotípica e a complexidade da interação gênica na determinação da suscetibilidade às doenças mentais (14). Dentre as regiões, até o momento, identificadas mostraram-se promissoras: 2p, 4p, 4q, 6q, 8q, 11p, 12q, 13q, 16p, 16q, 18p, 18q, 21q, 22q e Xq (15).

Os estudos de associação examinam se uma variação específica de um gene está associada à doença. Os genes candidatos hipoteticamente contribuem para a doença devido a sua participação em um caminho metabólico importante para o fenótipo.

Vários genes candidatos foram investigados em estudos de associação no TB. Contudo, até o momento não há um gene causador ou um fator de risco genético determinado para o TB. Alguns genes candidatos, definidos através de estudos de genética molecular, podem ser citados: PERIOD3, RGS4, DISC1, IL-1 cluster, SST, WFS1, PDLIM5, FAT, DRD1, GRM3, GRM4, NRG1, HSPA5,

ARNTL, NCAM1, HTR3B, GRIN2B, TIMELESS, CUX2, FLJ32356, DAO, Citron, G72(DAOA), GCH1, GABRA5, SLC12A6, NAPG, CHMP1.5, PIK3C3, AD4D2, TRPM2, BCR, MLC1, SYNGR1, GPR50, mtDNA3644, mtDNA3243, TAAR6, ADRA1C, CHRNA2, PIP5K2A, ADRA2A, BDNF, TPH1, DRD4, DRD2, FEZ1, NTF3, TPH2, NOS1, HTR2A, HTT, ERDA1, CTG18.1, SYNJ1, ZDHHC8, XBP1, MAOA, PCDH11Y (16).

Dentre muitos destes genes candidatos para o fenótipo de transtorno de humor destaca-se o do BDNF que parece estar envolvido na patofisiologia do TB (17).

O polimorfismo do BDNF val66met é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que na posição 196/758 produz uma substituição do aminoácido valina por uma metionina no codon 66 (val66met) do cromossomo 11p13 (NCBI SNP Cluster ID: rs6265).

Existem algumas evidências da associação deste polimorfismo com doenças do sistema nervoso central como em um estudo recente de Gratacos *et al.* (18), onde foi verificada, através de uma metanálise, a associação entre o polimorfismo do BDNF val66met com transtornos alimentares, transtorno relacionados a substâncias e esquizofrenia. Apesar disso, Lee *et al.* (19) demonstraram em um estudo *post mortem* em pacientes com Alzheimer que os níveis cerebrais de BDNF não diferem entre os diferentes genótipos do polimorfismo.

No TB, Neves–Pereira *et al.* (20) e Sklar *et al.* (21) mostraram uma associação do polimorfismo do BDNF com TB em estudos de associação com famílias. Estudos posteriores confirmaram tal associação (22).

Esta alteração da expressão do BDNF também foi vista em algumas especificações do TB como em recentes estudos de Green B *et al.* (23) e de Muller DJ *et al.* (24) que demonstraram uma associação do polimorfismo val66met do BDNF com pacientes cicladores rápidos.

Além disso, outros estudos demonstraram associação deste polimorfismo com doença de início precoce (25, 26) e alterações cognitivas em TB (27). A presença de heterozigose em humanos para o alelo Met do BDNF ($BDNF_{Met}$) demonstrou um prejuízo na memória (28). Este polimorfismo representa a primeira associação de uma alteração no BDNF com uma disfunção clínica.

Apesar desses achados que fortalecem a associação, existem também alguns resultados contraditórios negativos que não encontraram esta associação entre o polimorfismo do alelo val66met e TB. (29, 30, 31, 32). Estes resultados talvez sejam explicados pela diferença na etnia dos grupos em estudo, pois foram realizados, na sua maioria, com populações orientais.

2.2 O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

Apesar de diversas evidências de um fator genético estar envolvido na etiologia do TB, o papel das alterações bioquímicas na predisposição ao TB não foi totalmente elucidado. A regulação do humor envolve uma interação de múltiplos sistemas e a maioria das drogas efetivas provavelmente não atua sobre um sistema de neurotransmissão particular isoladamente, mas modula o balanço funcional entre os diversos sistemas que interagem. Evidências experimentais sugerem uma alteração no sistema de neurotransmissão de monoaminas, na

cascata de regulação e transdução sinais, bem como uma modificação da neuroplasticidade (33).

A neuroplasticidade refere-se à capacidade dos neurônios de se transformar e de adaptar a sua estrutura e função em resposta às exigências externas e internas do organismo.

Os fatores tróficos são substâncias responsáveis pela neuroplasticidade, estando também envolvidas no processo de formação da sinapse. Estas moléculas estimulam e permitem que os neurônios recebam nutrição adequada para que cresçam, se regenerem e se desenvolvam. A ausência destes fatores em níveis fisiológicos faz com que as células neurais diminuam sua atividade metabólica e as conexões sinápticas com as células adjacentes (34, 35).

As neurotrofinas são primeiramente sintetizadas como pré-pró neurotrofinas no reticulo endoplasmático rugoso (RER) e clivadas no complexo de Golgi pela furina ou nos grânulos secretores pelas pró-proteínas convertases, adquirindo então sua forma madura de neurotrofinas. Em geral, elas são armazenadas no *trans*-Golgi e então transportadas para o terminal axônico pré-sináptico ou dendritos pós-sinápticos para secreção local. A secreção celular de neurotrofinas pode ocorrer espontaneamente ou em resposta a um estímulo (36, 37).

As neurotrofinas podem ser liberadas de sítios extra-sinápticos ou sinápticos, exercendo diferentes funções, dependendo de seu local de secreção. As pró-neurotrofinas, como por exemplo, pró-NGF se liga ao receptor. p75 NTR e é a forma predominante na doença de Alzheimer, indicando que existe um balanço entre a forma pró e a madura e que a descompensação deste equilíbrio pode levar

a eliminação das sinapses, degeneração dos neurônios e conseqüentemente a um estado patológico (36).

A pró e a neurotrofina madura parecem interagir com diferentes receptores e exercer efeitos biológicos opostos. Diversas propriedades têm demonstrado que as neurotrofinas participam da plasticidade sináptica: liberação pós-sináptica das neurotrofinas e pré-sináptica de seus receptores; liberação de neurotrofinas durante o processo de despolarização; ação preferencial nos neurônios ativos; indução da sinapse junto com a síntese e liberação de neurotransmissores; ausência de neurotrofinas em sinapse deficiente (36).

O BDNF pertence à família das neurotrofinas juntamente com o fator de crescimento neural (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), NT-4, NT-5 e NT-6. Elas são agrupadas em uma mesma família, todas elas se ligam ao receptor $p75^{NTR}$ e cada uma delas se liga com alta afinidade a um receptor específico. O NGF liga-se em alta afinidade ao receptor Trk-A, o BDNF e o NT-4 ligam-se ao Trk-B e o NT-3 liga-se ao Trk-C (Fig 1) (36, 37, 38, 40).

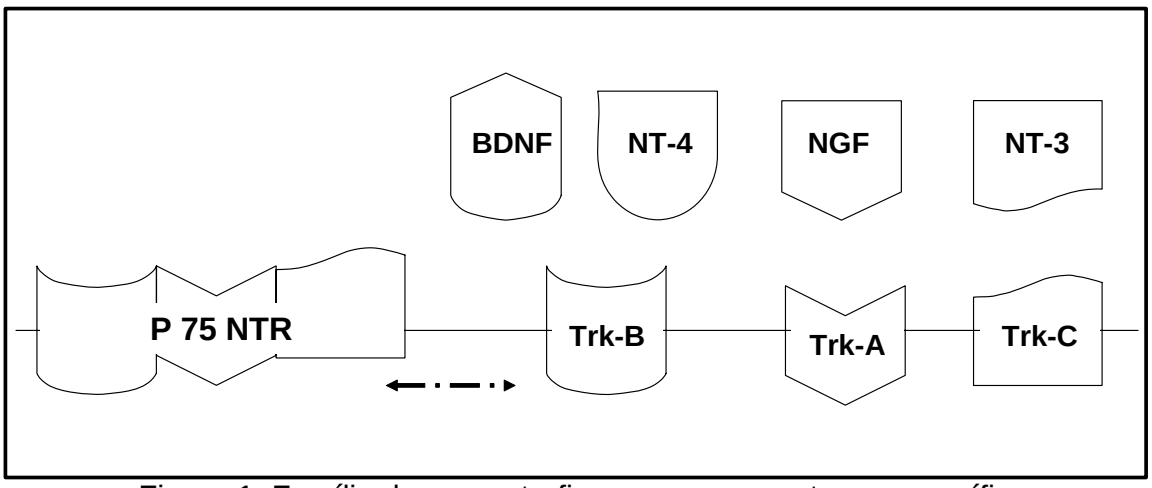


Figura-1: Família das neurotrofinas e seus receptores específicos

A estrutura do BDNF em solução observada em espectroscopia (FTIR) é compatível com a estrutura cristálica, contendo predominantemente fitas beta (aproximadamente 53%) e relativamente pouca concentração de outras estruturas secundárias incluindo beta *turns* (aproximadamente 16%), desordem estrutural (aproximadamente 12%) e rotações (aproximadamente 18%) e possui deficiência em alpha helix (39).

No cérebro o BDNF é ativado em algumas regiões como hipocampo, córtex cerebral e prosencéfalo — áreas vitais para o aprendizado e memória. O BDNF modula a plasticidade sináptica e a liberação de neurotransmissores através de múltiplos sistemas de neurotransmissão, bem como o sistema intracelular de transdução de sinais (40).

Podemos resumir alguns efeitos sinápticos importantes do BDNF:

1) Aumenta de forma marcada a freqüência espontânea de potenciais de ação nos neurônios do hipocampo;

2) Potencia circuitos inibitórios e excitatórios através de mecanismos diferentes;

3) Interfere na neuromodulação de inter-neurônios gabaérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos;

4) Estes efeitos sinápticos acontecem independentemente da sua ação ser aguda ou prolongada (40).

Ou seja, o BDNF é um fator necessário para sobrevivência, diferenciação e crescimento neuronal, sendo produzido nas plaquetas periféricas e no sistema nervoso central (41). Karege F *et al.* (42) demonstraram uma alta correlação positiva (r=0,81) entre os níveis séricos e corticais do BDNF, uma vez que esta

substância atravessa a barreira hematoencefálica. Desta forma, pode-se correlacionar os níveis corticais de BDNF com sua concentração sanguínea.

Chen *et al.* (43) verificaram que a presença do polimorfismo do BDNF altera o trafego e a regulação da secreção do BDNF em neurônios corticais e células neurosecretórias, mas sem esta alteração nas células endoteliais ou vasculares. Este achado é compatível com o prejuízo funcional associado com a presença do polimorfismo do BDNF em humanos, em que indivíduos $BDNF_{Met}$ possuem um prejuízo em tarefas cognitivas (10).

Alguns estudos apontam um papel importante do BDNF no mecanismo de ação de estabilizadores do humor, eletroconvulsoterapia e antidepressivos. A administração repetida de medicamentos antidepressivos aumenta a expressão do BDNF nas regiões límbicas, principalmente hipocampo, tanto em modelo animal quanto em humanos, sustentando a hipótese que o BDNF está envolvido na patogênese dos transtornos do humor e na ação terapêutica de alguns medicamentos (44, 45, 46, 47, 48). O valproato é capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos em cultura de células neurônio-glia e o provável mecanismo de proteção é a estimulação de fatores neurotróficos, BDNF e GDNF (49).

Além disso, parece existir uma diminuição do nível sérico de BDNF em pacientes com depressão unipolar (50, 8). Associado a estes achados, Cunha AB *et al.* (51) evidenciaram uma diminuição do BDNF nas fases agudas de mania e depressão em pacientes bipolares quando comparados a controles; também Machado-Vieira R *et al.* (52) avaliaram pacientes bipolares especificamente na fase maníaca, apoiando esses estudos prévios, identificou, da mesma forma, uma diminuição dos níveis séricos do BDNF.

Todas estas particularidades do BDNF apontam uma contribuição desta substância na patofisiologia do transtorno bipolar.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th. Ed. (DSM-IV). Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.

(2) Organização Mundial da Saúde. Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

(3) Goodwin FK, Jamison KR. Maniac-depressive illness. New York. University Press, 1990.

(4) Belmaker RH. Bipolar Disorder. New England Journal of Medicine 2004, 351: 476–486.

(5) Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon DA, Leon AC, Rice JA, Keller MB. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. Archives of General Psychiatry 2002, 59(6):530-537.

(6) Busnello ED, Pereira MO, Knapp WP et al. Morbidade psiquiátrica na população urbana de Porto Alegre. Jornal Brasileiro de Psiquiatria 1992, 41(10): 507-512.

(7) Vieta E, Colom F, Martinez Aran A. Trastorno bipolar. En M. Roca (ed). Trastornos del Humor. Madrid: Panamericana 1999, 493-540.

(8) Lima IVM, Sougey EB, Vallada Filho HP. Genética dos transtornos afetivos. Revista de Psiquiatria Clínica 2004, 31(1): 34-39.

(9) Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. Brain Research Reviews 2004, 45:104-114.

(10) Egan MF Kojima M, Callicot JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsey E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 2003, 112(2):257-269.

(11) Craddock N and Jones I. The genetics of bipolar disorder. Journal of Medical Genetics 1999; 36(8):585-594.

(12) Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. Journal of Medical Genetics 2005, 42:193–204.

(13) Cardno AG, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, Ribchester TR, Dayies NJ, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM. Heridability estimates for psychotic disorders. Archives of General Psychiatry 1999, 56:162-168.

(14) Hasler G, Drevets WC, Gould TD, Gottesman II, Manji HK. Toward constructing an endophenotype strategy for bipolar disorders. Biological Psychiatry 2006, 60(2):93-105.

(15) Hayden EP, Nurnberger JI Jr. Molecular genetics of bipolar disorder. Genes, Brain, and Behavavior 2006, 5(1):85-95.

(16) Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder and depression. Psychiatry and Clinical Neuroscience 2007, 61:3-19.

(17) Green, E., Craddock, N., 2003. Brain-derived neurotrophic factor as a potential risk locus for bipolar disorder: Evidence limitations, and implications. Curr. Psychiatry Rep. 5, 469-476

(18) Gratacos M, Gonzalez JR, Mercader JM, Cid RD, Urretavizcaya M, Estivill X. Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met and Psychiatric Disorders: Meta-Analysis of Case-Control Studies Confirm Association to Substance-Related Disorders, Eating Disorders, and Schizophrenia. Biological Psychiatry 2007. *in press*

(19) Lee J, Fukumoto H, Orne J, Klucken J, Raju S, Vanderburg CR, Irizarry MC, Hyman BT, Ingelsson M. Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. Experimental Neurology. 2005, 194:91-96.

(20) Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. American Journal of Human Genetics 2002, 71:651-655.

(21) Sklar P, Gabriel SB, Mc Innis MG, Benett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES. Family based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neurotrophic factor. Molecular Psychiatry 2002, 7:579–593.

(22) Lohoff FW, Sander T, Ferraro TN, Dahl JP, Gallinat J, Berrettini WH, Confirmation of association between the val66met polymorphism in the brain-

derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar I disorder. American Journal of Medical Genetics. Neuropsychiatric Genetics 2005, 139B:51-53.

(23) Green EK, Raybold R, Macgregor S, Hyde S, Young AH, O'Donovan MC, Owen MJ, Kirov G, Jones L, Jones I, Craddock N. Genetic variation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in bipolar disorder. British Journal of Psychiatry 2006, 188:21-25.

(24) Muller DJ, DE Luca, Sicard T, N King, Strauss J, Kennedy JL. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and rapid-cycling bipolar disorder: Family-based association study. British Journal of Psychiatry 2006, 189:317-323.

(25) Strauss J, Barr CL, George CJ, King N, Shaikh S, Devlin B, Kovacs M, Kennedy JL. Association study of brain-derived neurotrophic factor in adults with a history of childhood onset mood disorder. American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics 2004, 131(1):16-19.

(26) Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EHJ. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. American Journal of Psychiatry 2004, 161:1698–1700.

(27) Rybakowski JK et al. Illness-specific association of val66met BDNF polymorphism with performance on Wisconsin Card Sorting Test in bipolar mood disorder. Molecular Psychiatry 2006, 11(2):122-124.

(28) Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana B, Callicott J, Egan MF, Weinberger DR. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. Journal of Neuroscience 2003, 23:6690-6694.

(29) Hong CJ, Huo SJ, Yen FC, Tung CL, Pan GM, Tsai SJ. Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and mood disorders, age of onset and suicidal behavior. Neuropsychobiology 2003, 48(4):186-189.

(30) Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, Katsu T, Tamaka Y, Hamamura T, Kuroda S. Association study of the brain-derived neurotrophic factor gene with bipolar disorder. Neuroscience Letters 2003, 337(1): 17-20.

(31) Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, Sakamoto K, Fukunaga T, Inada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Yamada K, Yoshikawa T. No association between the val66met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor and bipolar disorder in a Japanese population: a multicenter study. Biological Psychiatry 2004, 56: 376-378.

(32) Oswald P, Del-Favero J, Massat I, Souery D, Claes S, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J. Non-replication of the brain-derived neurotrophic factor association in bipolar affective disorder: a Belgian patient-control study. American Journal of Medical Genetics 2004, 129b(1): 34-35.

(33) Chen G, Hasanat KA, Bebchuk JM, Moore GJ, Glitz D, Manji HK. Regulation of signal transduction pathways and gene expression by mood stabilizers and antidepressants. Psychosomatic Medicine 1999, 61(5):599-617.

(34) Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. Prog Neurobiol 2003, Apr;69(5):341-74. Review. Erratum in: Progress in Neurobiology 2004, 72(2):165-166.

(35) Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. Genomics 1991, 10(3):558-568.

(36) Lim KC, Lim ST, Federoff HJ. Neurotrophin secretory pathways and synaptic plasticity. Neurobiology of Aging 2003, 24(8): 1135-1145.

(37) Twiss JL, Chang JH, Schanen NC. Pathophysiological mechanisms for actions of the neurotrophins. Brain Pathology 2006, 16(4):320-332.

(38) Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian proprotein convertases. Biochemical Journal 1996, 15(314): 951-960.

(39) Li T, Talvenheimo J, Zeni L, Rosenfeld R, Stearns G, Arakawa T. Changes in protein conformation and dynamics upon complex formation of brain-derived neurotrophic factor and its receptor: investigation by isotope-edited Fourier transform IR spectroscopy. Biopolymers 2002, 67(1):10-19.

(40) Manji H, Queiroz JA, Sporn *et al*. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult to treat depression. Biological Psychiatry 2003, 53:707-742.

(41) Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. Trends Neuroscience 2000, 23: 639-645.

(42) Karege F *et al*. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. Neuroscience Letters 2002, 328:261-264.

(43) Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng C, Teng K, Hempstead BL, Lee FS. Variant brain derived neurotrophic factor (BDNF) (met66) alters the intracellular trafficking

and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. The Journal of Neuroscience 2004, 24(18):4401-4411.

(44) Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. The Journal of Neuroscience 1995, 15(11):7539-7547.

(45) Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. Biological Psychiatry 2001, 50:260-265.

(46) Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. Neuropharmacology 2002, 43(7):1173-1179.

(47) Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in animal model of mania. Life Science 2006, 79(3): 281-286.

(48) Gonul, A.S., Akdeniz, F., Taneli, F., Donat, O., Eker, C., Vahip, S., 2005. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 255(6), 381-386.

(49) Chen PS, Peng GS, Li G, Yang S, Wu X, Wang CC, Wilson B, Lu RB, Gean PW, Chuang DM, Hong JS. Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. Molecular Psychiatry 2006, 11:1116-1125.

(50) Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decresed serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. Psychiatry Research 2002, 109:143-148.

(51) Cunha ABM, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. Neuroscience Letters 2006, 398:215-219.

(52) Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, Souza DO, Portela LV, Gentil V. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode. Biological Psychiatry 2007, 61(2):141-143.

(53) Hamilton M. A rating scale for depression. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 1960, 23: 56-62.

(54) Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. British Journal of Psychiatry 1978. 133: 429-435.

(55) Miller SA, Dykaes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research 1988, 16:1215.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Principal

- Avaliar a associação entre o polimorfismo val66met do gene do BDNF com o nível sérico de BDNF em pacientes com TB estabilizados

4.2 Objetivo Secundário

- Avaliar a associação entre o polimorfismo val66met do gene do BDNF com a presença de TB em uma amostra de pacientes do programa de atendimento do transtorno de humor bipolar

5 PROTEÇÃO DOS DIREITOS HUMANOS

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado (ANEXO 1) previamente ao estudo. Foi assegurada a ausência de vinculação da concordância em participar do estudo com a continuidade do atendimento no programa de atendimento de transtorno de humor bipolar (PROTAHBI).

Posteriormente foram coletados dos pacientes 5mL de sangue venoso em tubos EDTA. As amostras foram armazenadas de forma a assegurar que a identificação de cada participante fosse possível apenas por um pesquisador.

Este estudo abrangeu os princípios bioéticos de autonomia, beneficência, não-maleficência, veracidade e confidencialidade, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o protocolo de número 05069.

6 MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Todos os indivíduos deram seu consentimento informado após uma explicação clara sobre os procedimentos a serem realizados no estudo. Devido a restrições editoriais do artigo que segue, a metodologia do estudo será descrita neste item.

Cento e quatorze pacientes caucasianos com transtorno afetivo bipolar tipo I foram selecionados do Programa do Transtorno de Humor Bipolar (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil). Os diagnósticos psiquiátricos foram realizados através de uma entrevista clínica estruturada de acordo com DSM-IV Eixo I (SCID-I). Cento e trinta e sete controles sem TB foram pareados por idade, sexo e grau de escolaridade. Os controles eram não-fumantes, não estavam sob o uso de medicação e não tinham história prévia e/ou atual de transtornos psiquiátricos, demência, retardo mental, câncer e não possuíam tais transtornos em familiares de primeiro grau.

Os sintomas maníacos e depressivos foram avaliados através da Escala de Mania de Young (YMRS) (53) e da Escala de Depressão de Hamilton (HDRS) (54), respectivamente.

Foram retirados de cada indivíduo por venopunção 5mL de sangue em um tubo a vácuo com anticoagulante para análises bioquímicas e 5mL em um tubo a vácuo com EDTA para análise de DNA.

6.1 Análise de BDNF sérico

O sangue foi imediatamente centrifugado a 3000 r.p.m. por 5 minutos e o soro foi congelado a -80^{o}C até a realização das análises bioquímicas. Os níveis séricos de BDNF foram aferidos através de um *kit* comercial *sandwich*-ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon, USA). Micro placas de titulação (*96-well flat-bottom*) foram revestidas por 24h com as amostras diluídas em 1:2 em diluente de amostras, a curva padrão variou de 7,8 a 5000pg de BDNF. As placas foram, então, lavadas quatro vezes com solução tampão, sendo adicionado anticorpo monoclonal anti-BDNF de coelho (dissolvido 1:1000 com diluente de amostra) e incubados por 3h a temperatura ambiente. Após a lavagem, foi realizada uma segunda incubação com anticorpo *anti-rabbit* peroxidase conjugada (diluído em 1:1000) por 1h a temperatura ambiente. Após a adição de enzima-estreptavidina, substrato e solução de parada a concentração de BDNF foi determinada (absorbância definida em 450 nm). A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica e a concentração de BDNF. A concentração de proteínas total foi quantificada pela técnica de Lowry, usando albumina bovina sérica como padrão.

6.2 Análise do DNA

O DNA foi extraído conforme o protocolo de Miller *et al.* (55). O DNA genômico purificado foi mantido à temperatura de -20ºC até a amplificação por PCR. Um fragmento de 113 pares de bases do gene do BDNF foi amplificado por

PCR com o primer descrito conforme Neves-Pereira *et al*. (20) em um termo ciclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, USA). Uma solução amplificada de 20 µL contendo 150–300ng de DNA genômico, 0.3 µM de cada *primer*, 0.17 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl2, 75 mM de Tris-HCl, 20 mM de (NH4)2SO4, 0.01% Tween 20 and 0.4 U de Taq DNA polimerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação inicial a 95^{o}C por 2min seguido de 35 ciclos a 94ºC por 30 s, 60ºC por 30 s, 72ºC por 30 s, e extensão final a 72ºC por 5min. Um volume de 6,5lL do produto do PCR foi digerido *overnight* em um volume total de 10 lL a 37ºC com 0.7 U da endonuclease de restrição Eco72I (MBI Fermentas). Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 2,5% (Prona, Spain) a 90 V e visualizado pela coração do brometo de etídio. O tamanho das bandas foi comparado ao DNA *ladder* pUC19DNA/MspI (MBI Fermentas). O produto media 113 pb (alelo A) para metionina. O alelo G (valina) correspondia a bandas de 78 e 35 pb. Testes para homozigose Met/Met foram repetidos para diminuir possíveis erros de genotipagem no momento da digestão. Todas as análises foram realizadas com o cegamento do estado dos indivíduos.

7 ARTIGO

7.1 Versão em Português

O polimorfismo val66met do fator neurotrófico derivado do cérebro e seus níveis séricos no transtorno bipolar

Molecular Psychiatry

Submetido em Dezembro 2006, aceito em Dezembro 2006

Juliana F Tramontina; Benício N Frey; Ana C Andreazza; Marília Zandona; Aida Santin; Flávio Kapczinski

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

[2] Programa de Transtorno Bipolar, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

[3] Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

[4] Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Palavras-chave: transtorno bipolar, fator neurotrófico derivado do cérebro, polimorfismo genético.

Existem fortes evidências que demonstram uma associação da herança genética com uma maior suscetibilidade ao transtorno bipolar (TB), contudo a interação entre polimorfismos genéticos e alterações bioquímicas permanecem desconhecidas. Um polimorfismo único do gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que substitui uma valina por uma metionina no códon 66 (val66met) parece estar envolvido no TB[1]. Especificamente, o polimorfismo do BDNF val66met foi associado com pacientes bipolares cicladores rápidos[2] e com alterações cognitivas no funcionamento[3].

Achados recentes do nosso grupo mostraram que os níveis séricos de BDNF estão diminuídos durante as fases agudas de mania e depressão, sugerindo que a regulação do BDNF pode estar envolvida na estabilização do humor[4]. Uma vez que o polimorfismo val66met do BDNF interfere no empacotamento e na secreção atividade-dependente do BDNF[5] e que existe uma forte correlação positiva entre os níveis séricos e cerebrais do BDNF[6], foi investigado neste trabalho se o polimorfismo val66met está associado com alterações nos níveis séricos de BDNF em pacientes bipolares e controles. A hipótese inicial foi que sujeitos portadores do alelo met (met/met + val/met genótipos) apresentariam níveis mais baixos de BDNF sérico em relação ao grupo val/val.

Cento e quatorze pacientes caucasianos com transtorno afetivo bipolar tipo I foram selecionados do Programa do Transtorno de Humor Bipolar (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil). Os diagnósticos psiquiátricos foram realizados através de uma entrevista clínica estruturada de acordo com DSM-IV Eixo I (SCID-I) e os sintomas maníacos e depressivos foram avaliados através da Escala de

Mania de Young (YMRS) e da Escala de Depressão de Hamilton (HDRS), respectivamente. Cento e trinta e sete controles sem TB foram pareados por idade, sexo e grau de escolaridade. Os controles eram não-fumantes, não estavam sob o uso de medicação e não tinham história prévia e/ou atual de transtornos psiquiátricos, demência, retardo mental, câncer e não possuíam tais transtornos em familiares de primeiro grau.

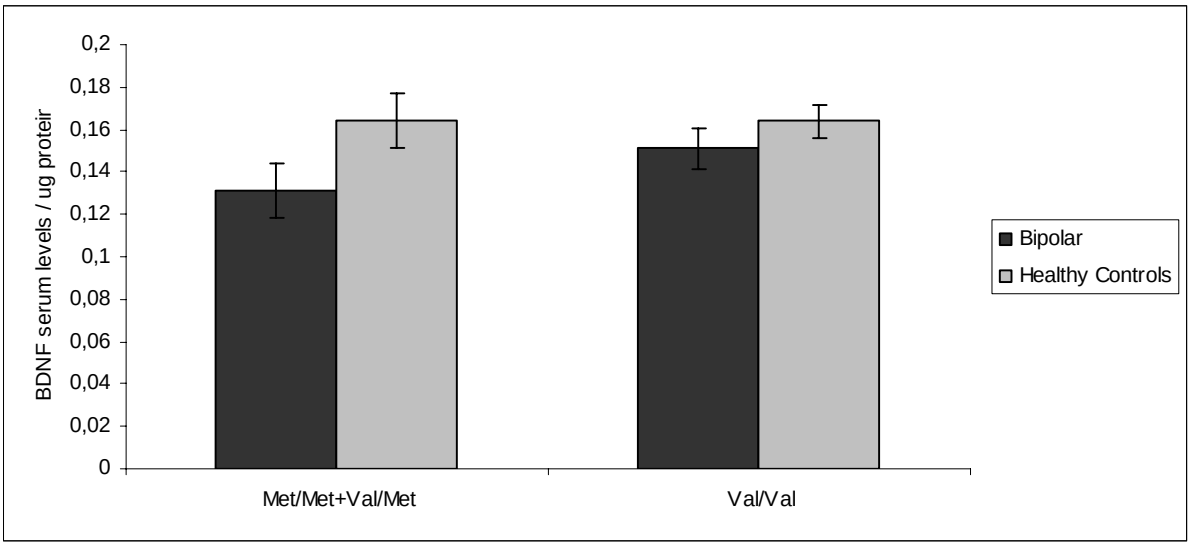
Foram retirados de cada indivíduo por venopunção 5mL de sangue em um tubo a vácuo com anticoagulante para análises bioquímicas e 5mL em um tubo a vácuo com EDTA para análise de DNA. Os níveis séricos de BDNF foram aferidos através de um *kit* comercial *sandwich*-ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon, USA). A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica e a concentração de BDNF. A proteína total foi medida pelo método de Lowry, sendo utilizada albumina sérica bovina como padrão. O DNA foi extraído utilizando-se procedimento padrão e o polimorfismo do BDNF val66met foi genotipado de acordo com Neves-Pereira *et al.*[7]. Todas as análises foram realizadas com o cegamento do estado dos indivíduos.

Não foi detectado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos de pacientes nem de controles ($p>0.05$; teste Qui-quadrado). A freqüência dos alelos foi a mesma freqüência apresentada previamente para população caucasiana [pacientes bipolares: val/val=73 (64%); val/met=37 (32.5%); met/met=4 (3.5%); controles: val/val=95 (69.3%); val/met = 40 (29.2%); met/met=2 (1.5%)]. Não houve diferenças significativas na freqüência dos genótipos do polimorfismo val66met do BDNF entre pacientes e controles ($p>0.05$; teste Qui-quadrado). Não foi encontrada associação entre o polimorfismo do gene do BDNF e o diagnóstico

de transtorno bipolar nos níveis séricos de BDNF (p=0.34; ANOVA Fatorial; Figura 1), indicando desta forma que o polimorfismo do BDNF val66met não interfere no nível sérico de BDNF em pacientes bipolares e controles sem TB. Os resultados foram mantidos após controle estatístico para os resultados da YMRS e da HDRS.

Estudos recentes demonstraram que os níveis séricos de BDNF estão diminuídos durante episódios agudos do TB[4,8] e durante o transtorno depressivo maior[9]. Além disso, a regulação dos níveis séricos de BDNF tem uma correlação negativa com a gravidade dos sintomas maníacos e depressivos[4,8], sendo também associada à resposta clínica do tratamento com antidepressivos[9], sugerindo que a medida de BDNF periférico possa ter um papel de marcador biológico nos transtornos de humor. Este estudo demonstra que o polimorfismo do BDNF val66met não afeta os níveis séricos do BDNF em uma amostra de indivíduos com TB eutímicos (média YMRS = 3.92; média HDRS = 9.27). Desta forma, podemos considerar que a variante $BDNF_{Met}$ diminui apenas a atividade dependente do BDNF, mas não a secreção constitutiva [5,10]; possivelmente este polimorfismo do BDNF exerça alguma influencia nos níveis séricos do BDNF durante os episódios agudos da doença.

Figura 1 - Níveis de BDNF sérico em relação ao polimorfismo do BDNF val66met em pacientes bipolares e controles



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Craddock N *et al*. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. J Med Genet 2005; **42**:193–204.

2. Green EK *et al.* Genetic variation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case-control study of over 3000 individuals from the UK. Br J Psychiatry 2006; **188**:21-25.

3. Rybakowski JK *et al*. Illness-specific association of val66met BDNF polymorphism with performance on Wisconsin Card Sorting Test in bipolar mood disorder. Mol Psychiatry 2006; **11**(2):122-124.

4. Cunha ABM *et al*. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. Neurosci Lett 2006; **398**:215-219.

5. Chen ZY *et al*. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. J Neurosci 2004; **24**(18):4401-4411.

6. Karege F *et al.* Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. Neurosci Lett 2002; **328**:261-264.

7. Neves-Pereira M *et al*. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family based association study. Am J Hum Genet 2002; **71**:651-665.

8. Machado-Vieira R *et al*. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode. Biol Psychiatry, in press.

9. Gonul AS *et al*. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 2005; **255**(6):381-386.

10. Egan MF *et al*. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 2003; **112**(2):257-269.

7.2 Versão em Inglês

Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and serum levels in bipolar disorder

Molecular Psychiatry

Submitted in December 2006, accepted in December 2006

Juliana Tramontina [1,2], Benício N Frey [2,3], Ana C Andreazza [2,3], Marília Zandona [4], Aida Santin [2], Flávio Kapczinski [1,2,3]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

[2] Programa de Transtorno Bipolar, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

[3] Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

[4] Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Key-words: bipolar disorder, brain-derived neurotrophic factor, genetic-polymorphism, biologic marker

There is strong evidence demonstrating that genetic inheritance is associated with higher susceptibility to bipolar disorder (BD) but the interaction between gene polymorphisms and biochemical changes remains largely unknown. A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene, which substitutes a valine for a methionine at the codon 66 (val66met), has been implicated to play a role in BD.[1] Specifically, the BDNF val66met polymorphism is associated with susceptibility to rapid-cycling[2] and altered cognitive performance in BD subjects[3]. Our group has recently reported that serum BDNF levels are decreased during acute manic and depressive BD patients, suggesting that the regulation of BDNF might be implicated in mood stabilization.[4] Considering that the val66met polymorphism affects intracellular packaging and activity-dependent secretion of BDNF[5] and that there is a strong positive correlation between brain and serum BDNF levels[6], we have investigated whether the val66met polymorphism is associated with changes in serum BDNF levels in BD patients and controls without BD. We hypothesized a priori that met carriers (met/met + val/met genotypes) would present lower levels of serum BDNF than the val/val group.

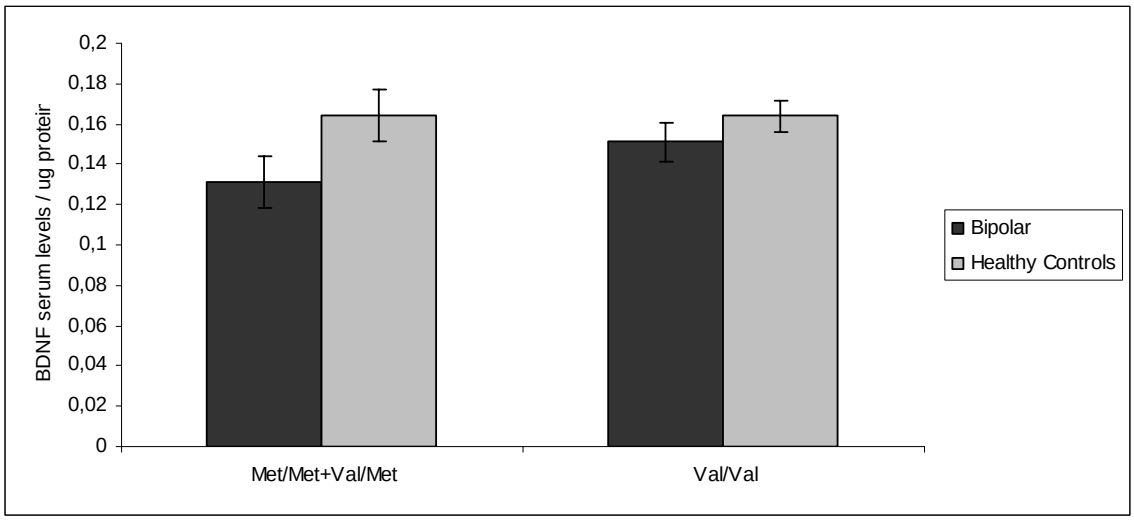
One hundred and fourteen Caucasian type-I bipolar patients were recruited from the Bipolar Disorders Program (Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil). Psychiatric diagnoses were carried out using the Structured Clinical Interview for DSM-IV-Axis I, and manic and depressive symptoms were assessed using the Young Mania Rating Scale (YMRS) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS), respectively. One hundred thirty-seven controls without BD were matched by age, gender and education. Control subjects were non-smokers, were not on medication, and had no history of major psychiatric disorders, dementia, mental

retardation, cancer or tumor, and no such disorders in their first-degree relatives. Ten milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture into a free-anticoagulant vacuum tube for biochemical analyses and 5mL into an EDTA vacuum tube for DNA analyses. BDNF serum levels were measured using a commercial kit of sandwich-ELISA according to the manufacturer's instruction (Chemicon, USA). The standard curve demonstrated a direct relationship between optical density and BDNF concentration. Total protein was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard. The genomic DNA was extracted using standard procedures, and the BDNF val66met polymorphism was genotyped according to Neves-Pereira *et al.*[7]. All the assays were performed blind to the subject's status.

There were no significant deviations of patients and control groups from Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$; Chi-square test), and the prevalence of allele frequencies were consistent with those previously reported for Caucasian population [bipolar patients: val/val=73(64%); val/met=37(32.5%); met/met=4(3.5%); controls: val/val=95(69.3%); val/met=40(29.2%); met/met=2(1.5%)]. No significant differences were found in the frequency of the BDNF val66met genotype or allele distribution between patients and controls ($p>0.05$; Chi-square test). We have found no significant interaction between BDNF polymorphism and diagnostic status (bipolar disorder and controls) on serum BDNF levels ($p=0.34$; Factorial ANOVA; Figure 1), indicating that the BDNF val66met polymorphism does not affect serum BDNF levels in bipolar subjects and controls without BD. Results were kept unchanged when YMRS and HDRS scores were controlled for.

Recent studies showed that serum BDNF levels are decreased during acute major mood episodes in BD[4,8] and in major depressive disorder[9]. In addition the regulation of serum BDNF levels is negatively correlated to the severity of manic and depressive symptoms[4,8], and is associated with clinical response to antidepressant treatment[9], suggesting that peripheral BDNF measure could play a role as a neurobiological marker in major mood disorders. Here we demonstrate that the BDNF val66met polymorphism does not affect serum BDNF levels in a sample of mostly euthymic BD subjects (mean YMRS = 3.92; mean HDRS = 9.27). Considering that the BDNFmet variant decreases only the activity-dependent but not the constitutive BDNF secretion [5,10], it is possible that this polymorphism may exert some influence on serum BDNF levels during acute mood episodes.

Figure 1 - The results of serum BDNF levels and val66met polymorphism of BDNF gene in bipolar and control subjects



REFERENCES

1. Craddock N *et al*. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. J Med Genet 2005; **42**:193–204.

2. Green EK *et al.* Genetic variation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case-control study of over 3000 individuals from the UK. Br J Psychiatry 2006; **188**:21-25.

3. Rybakowski JK *et al*. Illness-specific association of val66met BDNF polymorphism with performance on Wisconsin Card Sorting Test in bipolar mood disorder. Mol Psychiatry 2006; **11**(2):122-124.

4. Cunha ABM *et al*. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. Neurosci Lett 2006; **398**:215-219.

5. Chen ZY *et al*. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. J Neurosci 2004; **24**(18):4401-4411.

6. Karege F *et al.* Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. Neurosci Lett 2002; **328**:261-264.

7. Neves-Pereira M *et al*. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family based association study. Am J Hum Genet 2002; **71**:651-665.

8. Machado-Vieira R *et al*. Decreased Plasma Brain Derived Neurotrophic Factor Levels in Unmedicated Bipolar Patients During Manic Episode. Biol Psychiatry, in press.

9. Gonul AS *et al*. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 2005; **255**(6):381-386.

10. Egan MF *et al*. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 2003; **112**(2):257-269.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra que o polimorfismo do BDNF val66met não afeta os níveis séricos do BDNF em uma amostra de indivíduos com TB eutímicos (média YMRS = 3.92; média HDRS = 9.27) (Figura 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a idade e freqüência do sexo feminino na amostra estudada (Tabela 1). Até onde sabemos, não há outro estudo publicado que tenha demonstrado que o polimorfismo val66met do BDNF altera as concentrações séricas do BDNF em indivíduos bipolares nem em indivíduos sem TB. Lee *et al.* (19) demonstraram em um estudo *post mortem* em pacientes com Alzheimer que os níveis cerebrais de BDNF não diferem entre os diferentes genótipos. Curiosamente, o TB tem sido associado tanto com a presença do polimorfismo do BDNF como com baixas concentrações de BDNF sérico. Estudos recentes mostraram que os níveis séricos de BDNF estão diminuídos nos episódios agudos do humor no TB e no Transtorno Depressivo Maior. Além disso, os níveis séricos de BDNF possuem uma correlação negativa com a gravidade dos sintomas maníacos (51) e depressivos (10, 50) sugerindo que a medida de BDNF periférico possa ter um papel de marcador neurobiológico nos transtornos do humor.

Talvez a interferência do polimorfismo seja percebida clinicamente apenas nos momentos de episódios do humor em que a produção deste fator neurotrófico não compensa os danos causados em tal estado, possivelmente desencadeando os sintomas clínicos associados com a diminuição do BDNF. Ou seja, é possível

que este polimorfismo exerça alguma influência nos níveis séricos de BDNF apenas durante os episódios agudos da doença, em que existe uma grande necessidade de ativação da plasticidade neuronal e possivelmente os $BDNF_{Met}$ *carriers* não conseguem suprir (Figura 2). Esta hipótese pode ser auxiliada pelo fato de que a variante $BDNF_{Met}$ diminui apenas a atividade dependente do BDNF, mas não a secreção constitutiva como revisado em estudo prévio de Chen *et al.* (42).

Além deste achado, vimos que não houve diferença significativa na freqüência dos genótipos do polimorfismo val66met do BDNF entre pacientes e controles. Os grupos $BDNF_{Val/Met}$ e $BDNF_{Met/Met}$ foram unidos em um mesmo grupo, denominado BDNF Met *carriers,* uma vez que não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$) em cálculo de análise de resíduos. Este dado está de acordo com as especulações atuais de que este polimorfismo provavelmente não está associado com o TB como um todo, mas provavelmente com subtipos de doença, como início precoce e cicladores rápidos, que provavelmente não foram vistos neste estudo devido ao baixo poder do tamanho amostral destes subgrupos (Tabela 2).

Algumas limitações do estudo devem ser levadas em consideração. Neste estudo todos os pacientes bipolares estavam em tratamento medicamentoso e não foram analisadas as diferentes categorias das medicações devido à variabilidade de esquemas terapêuticos utilizados; sendo, na maioria das vezes, mais de uma medicação. Desta forma, não podemos excluir a possibilidade do nível sérico do BDNF estar sendo influenciado pelo uso de antidepressivos e estabilizadores do humor. Alguns estudos demonstraram que os níveis de BDNF

podem ser alterados pelo uso de antidepressivos e estabilizadores de humor; esta situação poderia, assim, mascarar uma possível diferença entre indivíduos bipolares e controles neste estudo. Apesar disto, pode-se observar neste estudo a ausência da associação do $BDNF_{Met}$ com alteração dos níveis séricos em indivíduos normais. Deve-se também levar em consideração o fato dos pacientes selecionados estarem em diferentes estágios da doença, apesar do controle para os sintomas maníacos e depressivos, os diferentes números de episódios e duração de doença podem influenciar nos níveis séricos de BDNF. Uma afinidade diferente por diferentes genótipos ($BDNF_{Val}$ e $BDNF_{Met}$) nos anticorpos do ELISA do BDNF poderia ser uma limitação, contudo epitopos genéricos englobam diferenças muito pequenas nos diversos aminoácidos da seqüência do BDNF que esta não seria detectada pelo anticorpo.

Ou seja, o polimorfismo val66met do BDNF não afeta o nível sérico do BDNF em uma amostra de indivíduos bipolares tratados, possivelmente este polimorfismo possa exercer alguma influência no nível sérico do BDNF apenas durante os episódios agudos do transtorno de humor. Este estudo sugere uma integração dos achados genéticos aos achados bioquímicos no TB. Estudos futuros que avaliem esta integração entre genética e alterações bioquímicas poderiam esclarecer a possível influência do polimorfismo do BDNF em relação ao seu nível sérico. O recrutamento de indivíduos bipolares sem medicação é um desafio na maioria dos estudos. A realização de estudos com pacientes não-medicados ou na mesma população de bipolares em episódio agudo da doença, poderia esclarecer esta questão, sendo de extrema utilidade para esta hipótese.

Além disso, poderiam ser comparadas diferentes patologias com a população de bipolares, para um melhor entendimento da patofisiologia destas doenças.

Tabela 1. Freqüência do sexo feminino, média da idade, média da pontuação das escalas de depressão (HDRS)/mania (YMRS) e média do nível sérico de BDNF em 114 pacientes bipolares e 137 controles.

	Grupo Controle	Pacientes Bipolares	P
Idade	44,08(13,81)	42,54 (11,51)	0,866*
Sexo			0,677**
Feminino	67,2%	72,0%	
Masculino	32,8%	28,0%	
Média da HDRS	-	9.27	-
Média da YMRS	-	3.92	-
Média da concentração sérica do BDNF (DP) Pg/μl protein	0,16 (0,08)	0,1473 (0,08)	0,34*

* Teste t
**Qui-quadrado

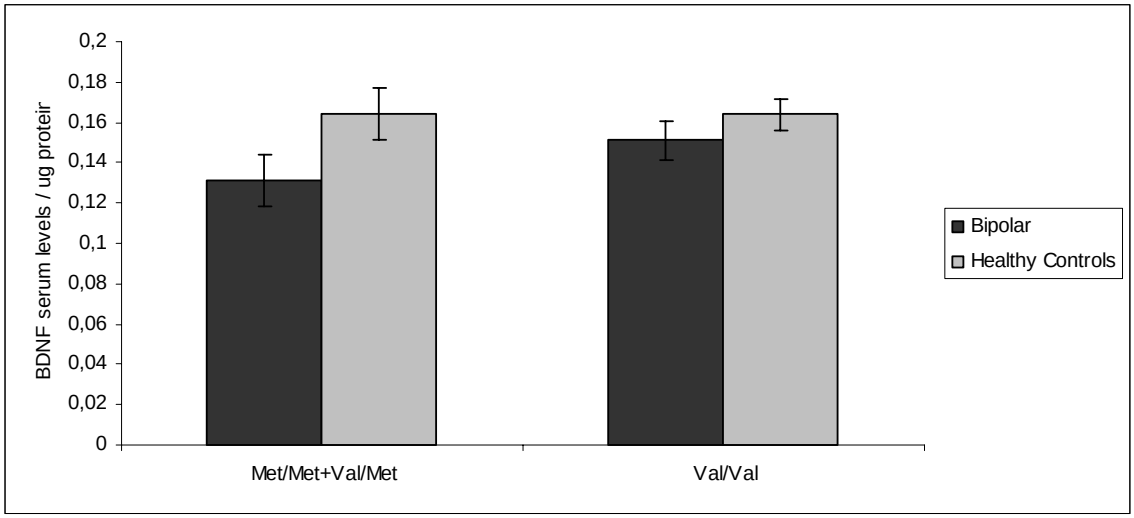
Tabela 2. Freqüência do genótipo e dos alelos do SNP val66met do BDNF em 114 pacientes bipolares e 137 controles

		Freqüência de Genótipos				**Freqüência dos alelos**		
	N	Val/Val	Val/Met	Met/Met	*P*	Val	Met	*P*
Bipolares	114	73 (64%)	37 (32.5%)	4 (3.5%)	0.456*	183	45	0.4761**

Controles	137	95 (69.3%)	40 (29.2%)	2 (1.5%)		230	44	

* Qui-quadrado
** P de Fischer

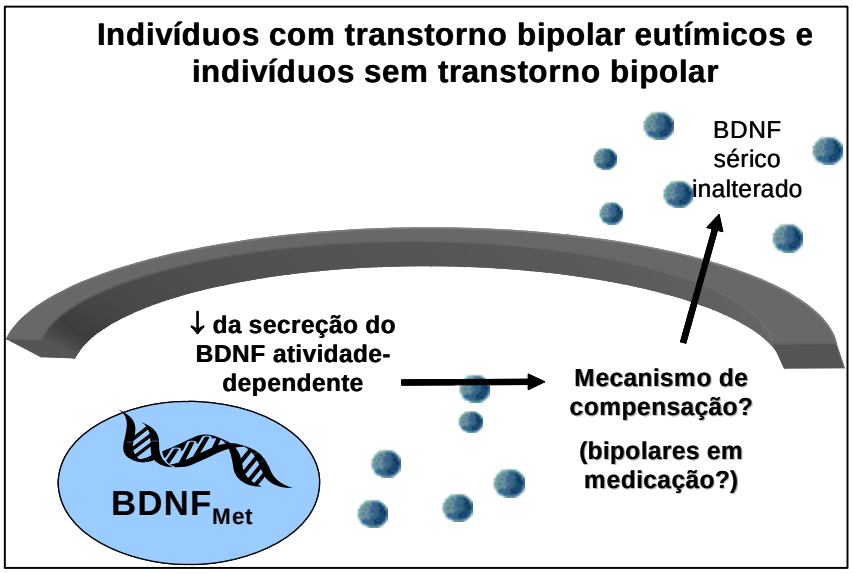
Figura 1 – Resultados do nível sérico e do polimorfismo val66met do BDNF em pacientes bipolares e controles



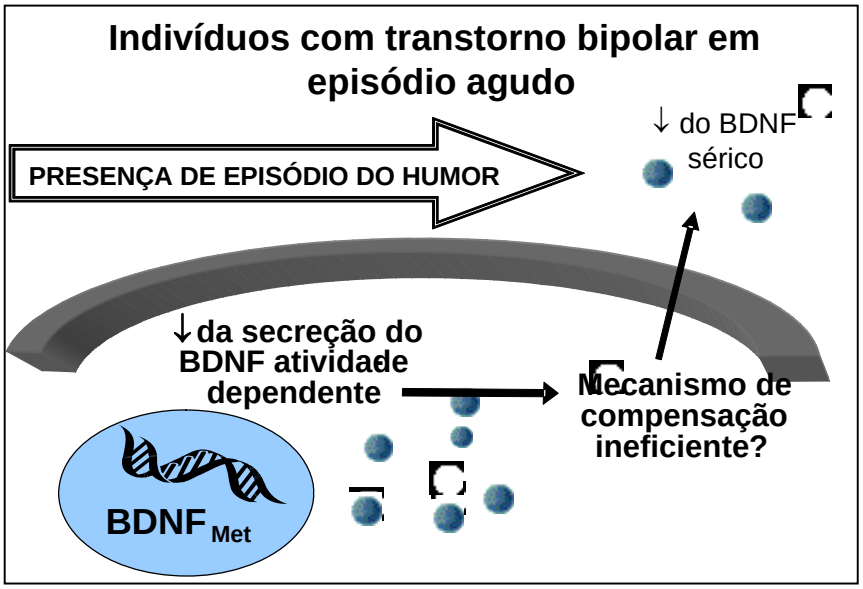
$p = 0.34$

Figura 2- Possível influência do $BDNF_{Met}$ nos níveis séricos de BDNF. **A.** Indivíduos com transtorno bipolar eutímicos e sem transtorno bipolar com $BDNF_{Met}$, apresentam uma diminuição da secreção do BDNF atividade-dependente que, através de um possível mecanismo de compensação, apresentam o nível sérico de BDNF inalterado. **B.** Indivíduos com transtorno bipolar com $BDNF_{Met,}$ em episódio agudo do humor, apresentam uma diminuição da secreção do BDNF atividade-dependente com um possível mecanismo de compensação ineficiente, diminuindo os níveis séricos de BDNF.

A.



B.



ANEXO 1 Escalas

- Escala de Hamilton - Depressão

Todos os itens devem ser preenchidos. Assinalar o número apropriado.

1. HUMOR DEPRIMIDO (Tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade)
    0. Ausente.
    1. Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.
    2. Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.
    3. Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a 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. Idéias de culpa ou ruminação sobre erros passados ou más ações.
    3. A doença atual é um castigo.
    4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

3. SUICÍDIO
    0. Ausente.
    1. Sente que a vida não vale a pena.
    2. Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte.
    3. Idéias ou gestos suicidas.
    4. Tentativa de suicídio (qualquer tentativa séria, marcar 4).

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 à noite - qualquer saída da cama marcar 2(exceto p/ 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 for incapaz de realizá-las sem ajuda.

8. RETARDO (lentidão de idéias 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, diarréia, cólicas, eructação;
Cardiovasculares: palpitações, cefaléia;
Respiratórios: hiperventilação, suspiros; Freqüência urinária; Sudorese

0. Ausente :
1. Leve
2. Moderada

3. Grave
4. Incapacitante

12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTRINTESTINAIS
0. Nenhum
1. Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdomen
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, cefaléia, mialgias.Perda de energia e cansaço.
2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2.

14. SINTOMAS GENITAIS
Sintomas 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 freqüentes, pedidos de ajuda,etc.
4. Idéias 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. CONSCIÊNCIA
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.

ANEXO 2 Protocolos

Protocolo de pacientes

Hospital de Clínicas de Porto Alegre **Serviço de Psiquiatria** Programa de Tratamento do Transtorno de Humor Bipolar Laboratório de Psiquiatria Experimental	Protocolo n°

Data do preenchimento: _____/_____/_____

Entrevistador: _____

1. Identificação

1.1. Prontuário HCPA: _____

1.2. Nome Completo:_____

1.3. Sexo: 1- masculino 2- feminino

1.4. Data de nascimento: _____/_____/_____

1.5. Idade: _____ anos

1.6. Etnia: 1- branco 2- não-branco

1.7. Situação Conjugal: 1- solteiro 2- casado ou companheiro fixo
3- separado ou divorciado 4- viúvo

1.8. Ocupação: 1- estudante 2- com ocupação (remunerada): _____
3- sem ocupação (não aposentado) 4- dona de casa
5- em auxílio-doença 6- aposentado por invalidez
7- aposentado por tempo serviço

1.9. Renda Individual: 1- sim 2- não

1.10. Renda Familiar: R$ _____ (U$ _____)

1.11. Escolaridade: _____Grau 1-Completo 2- Incompleto
(____ anos de estudo completos)

1.12. Repetência escolar:_____ anos repetidos

1.13. Sabe ler e escrever? 1- sim 2- Não

1.14. Endereço : _____

1.15. Cidade: _____CEP: _____-____

1.16. Telefone para contato: 1- _____

2 - _____

1.17. **Peso** atual (medido): _____ Kg **Altura** (medida):_____ m

IMC: _____ [Peso ÷ (altura)^2]

1.18. Menor peso da vida adulta (acima 18 anos): _____Kg / idade _____

1.19. Maior peso ao longo da vida: _____Kg / idade _____

1.20. Mudança no tamanho da roupa antes e depois do tratamento psiquiátrico:

1-sim 2-não 9-não sei Se sim, do tamanho _____ para tamanho_____

2. Características da Doença

2.1. Idade do 1º episódio: _____ anos (Tempo de evolução da doença: _____anos)

2.2. Tipo do 1° episódio: 1 – Mania 2 – Depressão 3 – Misto

4- Hipomania 9- Não sabe

2.3. Idade que recebeu diagnóstico médico: _____ anos

2.4. Idade que usou medicação psiquiátrica pela primeira vez: _____ anos

(com indicação médica) Qual: _____

2.5. Idade que usou estabilizador do humor pela primeira vez: _____ anos

(com indicação médica) Qual: _____

2.6. Presença psicose no 1° episódio: 1-Sim 2-Não 9- Não sabe

2.7. 1° crise desencadeada por substância: 1- Sim 2- Não

Se sim: 1- Antidepressivo, Qual:

2- Maconha

3- Cocaína

4- Álcool

5 - Anorexígeno, qual: ( ) Anfetamina ( ) Sibutramina

6- Estimulantes (energéticos)

7- Hormônios, qual: ( ) anabolizantes ( ) tireóide

7- Outros, Qual: _____

2.8. Hospitalizações Psiquiátricas: 1- sim 2- não Se sim, quantas: _____

2.9. Idade na 1ª hospitalização psiquiátrica: _____ anos

Tipo de episódio(DSM-IV): 1 – Mania 2 – Depressão 3 – Misto

4- Hipomania 9- Não sabe

2.10. Idade na última hospitalização: _____ anos

Tipo de episódio (DSM-IV): 1 – Mania 2 – Depressão 3 – Misto

4- Hipomania 9- Não sabe

2.11. Ciclador rápido (4 ou mais episódios em um ano): 1- sim 2- não

2.12. Realizou ECT: 1-sim 2- não

Se sim, quantas séries: _____

2.13. Tentativa de suicídio: 1-sim 2-não

Se sim, número: _____vezes

Tipo tentativa: 1- arma fogo 2- enforcamento 3-cortar pulsos 4- medicação

5- pular de local alto 6-outro, qual: _____

3. <u>Hábitos</u>

3.1. Tabagismo Passado: 1- sim 2- não Se sim, tempo uso: _____anos

Tabagismo Atual: 1 – sim 2 - não Se sim, maior n° cigarros/dia: _____

3.2. Uso Atual Chá: 1 – sim 2 – não

Chimarrão: 1 – sim 2 – não

Café: 1 – sim 2 – não

4. Tratamento Psiquiátrico

4.1. Você já foi submetido a algum tratamento psiquiátrico? Sim Não

Quais **medicamentos** você tomou para qualquer dos comportamentos/ problemas psiquiátricos?

Nome da Medicação	**Já usou alguma vez?**		**Uso Atual**		**Dose Atual** (total/dia)
Alprazolan (**Frontal**)	Sim	Não	Sim	Não	
Ac. Valpróico (**Depakene**) / Divalproato (**Depakote**)	Sim	Não	Sim	Não	
Amitriptilina (**Tryptanol**)	Sim	Não	Sim	Não	
Biperideno (**Akineton**)	Sim	Não	Sim	Não	
Bupropiona (**Zyban**)	Sim	Não	Sim	Não	
Carbamazepina (**Tegretol**)	Sim	Não	Sim	Não	
Citalopram (**Cipramil**)	Sim	Não	Sim	Não	
Clomipramina (**Anafranil**)	Sim	Não	Sim	Não	
Clonazepan (**Rivotril**)	Sim	Não	Sim	Não	
Clonidina (**Atensina**)	Sim	Não	Sim	Não	
Clorpromazina (**Amplictil**)	Sim	Não	Sim	Não	
Clozapina (**Leponex**)	Sim	Não	Sim	Não	
Diazepan (**Valium**)	Sim	Não	Sim	Não	
Escitalopram (**Lexapro**)	Sim	Não	Sim	Não	
Fluoxetina (**Prozac)**	Sim	Não	Sim	Não	
Haloperidol (**Haldol**)	Sim	Não	Sim	Não	
Imipramina (**Tofranil**)	Sim	Não	Sim	Não	
Lítio (**Carbolitium**)	Sim	Não	Sim	Não	
Levomepromazina (**Neozine**)	Sim	Não	Sim	Não	
Lamotrigina (**Lamictal**)	Sim	Não	Sim	Não	
Metilfenidato (**Ritalina**)	Sim	Não	Sim	Não	
Mirtazapina (**Remeron**)	Sim	Não	Sim	Não	
Olanzapina (**Zyprexa**)	Sim	Não	Sim	Não	
Paroxetina (**Aropax**)	Sim	Não	Sim	Não	
Pimozida (**Orap**)	Sim	Não	Sim	Não	
Quetiapina (**Seroquel**)	Sim	Não	Sim	Não	
Risperidona (**Risperdal**)	Sim	Não	Sim	Não	
Sertralina (**Zoloft**)	Sim	Não	Sim	Não	
Sulpirida (**Equilid**;**Sulpan**)	Sim	Não	Sim	Não	
Venlafaxina (**Efexor**)	Sim	Não	Sim	Não	

Outras:	Sim	Não	Sim	Não	
	Sim	Não	Sim	Não	

5. História Familiar de Doença Psiquiátrica:

1- BipV: com diagnóstico de TH Bipolar validado
2- Internações psiquiátricas
3- Uso de Lítio
4- Uso de antipsicótico
5- Alucinações / "ficou louco"
6- Suicídio
7- Tentativas de suicídio
8- Álcool e drogas

Parentes	**+**	**-**	**?**	**Transtorno psiquiátrico**
Mãe				
Pai				
Irmãos				
N° Total:				
Filhos				
N° Total:				
Avó materna				
Avô materno				
Avó paterna				
Avô paterno				
Tios maternos				
N° Total:				
Tios paternos				
N° Total				
Primos Maternos				
Primos Paternos				

5.1. N° familiares de 1° grau acometidos por Transtorno Bipolar (BipV): _____membros

5.2. N° familiares de 1° grau acometidos por outras doenças psiquiátricas: _____membros

6. <u>Fatores relacionados ao sexo feminino</u>

(Obs: codificar para sexo masculino: 9- não se aplica)

6.1. Uso atual de método anticoncepcional: 1-sim 2-não

Se sim, Qual (is): 1-Anticoncepcional oral (pílula) 2- DIU
3-Camisinha 4- Diafragma 5- coito interrompido 6- L.Tubária
7- Vasectomia do marido 8- tabelinha _10- outro, qual: _____

6.2. Gestações: _____

6.3. Partos Normais: _____

6.4. Partos cesáreos: _____

6.5. Abortos: _____ espontâneos

_____ provocados

6.6. Menopausa: 1-sim 2-não Se sim, idade: _____anos.

6.7. Terapia de Reposição Hormonal (atual): 1-sim 2-não

7. <u>História de Doenças Clínicas</u> (atual e passada)

Use Quadro.

7.1. Você já teve alguma destas doenças? Marcar com um **X**

(Por favor, não deixe nada em branco)

1	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Infecção SNC (Poliomielite, encefalite, meningite)
2	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Infecção freqüente da garganta
3	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Coma
4	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Convulsão/ataques
5	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Ferimentos na cabeça (com perda de consciência)
6	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Enxaqueca
7	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Asma
8	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Diabetes
9	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Hipotireoidismo
10	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Hipertireoidismo
11	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Febre Reumática
12	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	Derrame cerebral
13	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	
14	**sim**	**Não**	**não sei**	**Quando**	

Se <u>SIM</u> para qualquer dos itens acima,
Qual (is) doença (s) foi (ram) diagnosticada(s) por um médico?

Anote o (s) n° correspondentes (linhas acima):

_____,_____,_____,_____,_____

Você é portador de alguma doença não perguntada?

Qual?_____

---

8. Desenvolvimento

8.1. Qual a idade da sua mãe quando você nasceu? _____ (marque **99** se não souber)

8.2. Existiu alguma intercorrência durante a sua gestação? (infecções, traumas)

( ) sim ( ) não ( ) não sei

Se sim, qual? _____

8.3. Durante a sua gestação sua mãe fez uso de

Medicações? ( ) sim ( ) não ( ) não sei

Se sim, qual? _____

Drogas? ( ) sim ( ) não ( ) não sei

Se sim, qual? _____

Cigarro? ( ) sim ( ) não ( ) não sei

Álcool? ( ) sim ( ) não ( ) não sei

8.6.Seu parto foi 1-normal ou 2- cesariana ?

8.7. Existiu alguma complicação durante o seu nascimento como

Prematuridade ( ) sim ( ) não ( ) não sei

Circular de cordão ( ) sim ( ) não ( ) não sei

Uso de fórceps ( ) sim ( ) não ( ) não sei

8.8. Você teve alguma complicação após o nascimento, necessitando hospitalização?

( ) sim ( ) não ( ) não sei

8.9. Você teve algum atraso no desenvolvimento? (sentar, caminhar, falar)

( ) sim ( ) não ( ) não sei

Protocolo de controles

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Psiquiatria
Programa de Tratamento do Transtorno de Humor Bipolar
Laboratório de Psiquiatria Experimental

Protocolo controle nº.

Nome completo: _____

Sexo: ☐ feminino Idade: _____
☐ masculino

Endereço: _____

Cidade: _____

Telefones para contato: 1) _____
2) _____

Etnia: ☐ branco
☐ não branco

Renda familiar: R$ _____ (U$ _____)

Uso atual de medicamentos psiquiátricos? ☐ sim ☐ não

Uso atual de drogas (cocaína, crack, maconha, etc.)? ☐ sim ☐ não

Uso atual de cigarro? ☐ sim ☐ não

Diagnóstico pelo SCID de Transtorno Bipolar I ou II? ☐ sim ☐ não

Doença neurológica? □ sim □ não

História familiar de doença neurológica? □ sim □ não

ANEXO 3 Termo de Consentimento Informado

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO:

Nome: Data de Nascimento:
Médico Supervisor: Juliana Tramontina

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer outra dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a médica Juliana Tramontina pelo telefone (051)84013233, segundas e sextas-feiras.

Qual o objetivo desta pesquisa?
Conhecer características clínicas dos pacientes e sua possível relação com alterações genética. Existe uma possibilidade de associação dessa alteração genética com o transtorno bipolar, mas mais estudos devem ser feitos para constatar tal afirmação. Ou seja, este estudo tem por objetivo, de uma forma geral, conhecer um pouco melhor como "funciona" o transtorno bipolar.

O que acontecerá neste estudo?
Após os pacientes responderem às questões em estudo através de questionários será feito um exame de sangue. Este exame será utilizado apenas para observar uma alteração chamada polimorfismo em um local do gene chamado val66met.

Quais os benefícios em participar deste estudo?
A sua participação neste estudo poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido, e no âmbito coletivo, poderá ajudar no desenvolvimento de maior conhecimento do transtorno bipolar principalmente em relação às causas da doença e como ela funciona.

Quais são os direitos dos participantes?
Os pesquisadores deste estudo podem precisar examinar os seus registros, a fim de verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser enviados para publicação em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação no estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, isto não afetará o tratamento normal ao qual você tem direito.

Quais são os riscos que envolvem este estudo?
Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de punção venosa.

Quais são as responsabilidades dos participantes?
Os participantes deste estudo comprometem-se a comparecer às consultas marcadas, bem como responder fidedignamente as escalas aplicadas pelos médicos pesquisadores e as escalas auto-aplicáveis.

1. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de minha pessoa.

2. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura na instituição.

3. Estou ciente de que a informação nos meus registros médicos é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente, ou seja, não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, o uso dos resultados que possam surgir deste estudo.

4. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo; tenho mais de 18 anos.

Assinatura do Paciente
Ass:
Data:

Assinatura do Médico Supervisor
Ass:
Data:

Assinatura do Familiar Responsável pelo Paciente
Ass:
Data:

Se você tiver qualquer dúvida poderá ligar para a médica Juliana Tramontina no telefone (051)84013233, segundas ou sextas-feiras, das 16hs às 20hs.

Data:

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA VOLUNTÁRIOS:

Nome: Número do protocolo:
Pesquisador:

Esta é uma pesquisa para identificar substâncias que podem estar alteradas no sangue de indivíduos portadores de Transtorno de Humor Bipolar. Nesta pesquisa os voluntários serão convidados a participar através da coleta de uma amostra de sangue e do preenchimento de algumas questões. O sangue coletado será armazenado e essas substâncias serão avaliadas em conjunto com alguns dados coletados de pacientes.

Esta pesquisa é considerada como de risco mínimo para a saúde, podendo ocorrer apenas um mal-estar passageiro ou manchas roxas no local da coleta de sangue. Seu nome e seus dados serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores do PROTAHBI, sendo estes dados utilizados somente para pesquisa.

Eu, _____,
fui informado(a) dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa de acordo com essas informações, sem que isto me traga prejuízos.

Assinatura do voluntário Assinatura do pesquisador

Local e data

Em caso de qualquer outra dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a médica Juliana Tramontina pelo telefone (051)84013233 ou o Dr. Flávio Kapczinski pelo telefone (51)32227309.