

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria

Pâmela Ferrari

**POLARIZAÇÃO M1 E M2 DA LINHAGEM U-937 DE MACRÓFAGOS EM MEIO DE
SORO DE PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR**

Porto Alegre

2016

Pâmela Ferrari

**Polarização M1 e M2 da linhagem U-937 de macrófagos em meio de soro de
pacientes com Transtorno Bipolar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Psiquiatria.

Orientadora: Adriane Rosa Ribeiro

Co-orientador: Rafael Colombo

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Ferrari, Pâmela
Polarização M1 e M2 da linhagem U-937 de macrófagos
em meio de soro de pacientes com Transtorno Bipolar
/ Pâmela Ferrari. -- 2016.
57 f.

Orientadora: Adriane Rosa Ribeiro.
Coorientador: Rafael Colombo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Transtorno Bipolar. 2. Polarização de
macrófagos. 3. Neuroinflamação. I. Rosa Ribeiro,
Adriane, orient. II. Colombo, Rafael, coorient.
III. Título.

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade!”*

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao prof. Flávio Kapczinski, por ter me dado oportunidade de ingressar no laboratório de Psiquiatria Molecular e iniciar a minha jornada na pesquisa;

À todos do laboratório de Psiquiatria Molecular que contribuíram para o meu desenvolvimento neste tempo;

Ao meu co-orientador, Rafael Colombo, por toda ajuda, pela paciência, por muitas vezes ser o meu orientador, por toda calma que me foi passada, por ter ganhado um amigo;

À minha orientadora, Adriane Ribeiro, que aceitou me orientar, pela ajuda e dedicação, pela confiança em mim depositada, por sempre ver uma luz no final do túnel, pelos ensinamentos, por me inspirar;

À todos da bancada do laboratório, meus colegas e amigos, que estiveram ao meu lado me ajudando, incentivando, participando de muitos momentos da minha vida, principalmente dos muitos momentos bons: André B., André P., Bianca A., Bianca P., Bruna Maria, Bruna, Carol, Duda, Ellen, Emily, Giovana, Luiza, Maurício, Roberta.

Aos meus amigos que não se encontram no Brasil, Laura, Biel, Gabi e Thaís, que fazem falta no meu dia a dia;

Á todos os pacientes que contribuem para as pesquisas e a busca de uma melhor qualidade de vida para os que são acometidos por este transtorno tão grave;

Aos meus pais, Roque e Goreti, por sempre me apoiarem, acreditarem em mim e nos meus sonhos, por toda a compreensão e amor incondicional a mim dedicado. Vocês são meus exemplos de guerreiros e de amor maior. Amo vocês!

RESUMO

O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença psiquiátrica grave, altamente incapacitante que está associada com diversas comorbidades médicas e altas taxas de suicídio. Embora sua fisiopatologia não esteja completamente elucidada, inúmeros estudos têm mostrado alterações no sistema imune de indivíduos com TB. A resposta crônica destes indivíduos ao estresse parece gerar um aumento da inflamação sistêmica bem como da neuroinflamação. A micróglia ativada devido aos estímulos inflamatórios contínuos deve ocasionar diferentes prejuízos tanto bioquímicos quanto funcionais. Os macrófagos, primeira linha de defesa, são células de característica plástica de extrema importância do sistema imune e podem ser estimulados a polarizar para diferentes formas com liberação de fatores pró e anti-inflamatórios, estimulando ou mantendo a homeostase no ambiente agredido de alguma forma.

Desta forma, nosso trabalho buscou investigar a resposta fenotípica dos macrófagos contra o meio ambiente pró-inflamatório sistêmico observado no plasma de pacientes bipolares eutímicos, maníacos e depressivos em comparação aos controles. A amostra incluiu 5 controles saudáveis, 8 pacientes bipolares remetidos, 5 pacientes maníacos e 5 pacientes depressivos. As citocinas e quimiocinas de RNAm em células U937 tratadas com plasma mostraram um padrão de expressão diferente relativo entre controles saudáveis e pacientes com TB. As citocinas inflamatórias tais como IL-1 β e TNF- α , em pacientes bipolares maníacos e depressivos demonstram maiores quantidades de IL-1 β mRNA do que os pacientes eutímicos e pacientes depressivos induziram maiores quantidades de RNAm de TNF- α do que os pacientes eutímicos em células U937. Já a expressão das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 no plasma de pacientes com TB depressivos, demonstraram ser de menor expressão significativa no grupo de pacientes maníacos quando comparados a controles e pacientes bipolares eutímicos. Nossos resultados sugerem que as citocinas periféricas devem modular a polarização M1 ou M2 de macrófagos no TB.

Palavras chave: Transtorno Bipolar, Polarização macrófagos, Neuroinflamação.

ABSTRACT

Bipolar Disorder (BD) is a severe and highly incapacitating psychiatric disorder which is associated with the presence of medical comorbidities. The progression of BD is related to an important cognitive deficit and also to biological and clinical manifestations that lead to treatment resistance and worse prognosis. Immune disturbances have been widely observed and investigated in BD patients. Chronic inflammatory responses induce neuroinflammation, mainly by pro-inflammatory microglial activation, and result in biochemical and functional impairment. Macrophages are the first line of defense of the immune system and exhibit cell plasticity. As well, microglia represents the resident macrophage of the central nervous system been responsible for its protection. Both cells can be stimulated to polarize into two different phenotypes, mainly pro- and anti-inflammatory, maintaining the homeostasis under physiologic and pathologic conditions. Therefore, we aimed to investigate macrophages phenotypical response when submitted to BD patients plasma in different episodes, which is considered a pro-inflammatory environment, and healthy controls plasma.

Subjects included healthy controls (n=5), remitted BD patients (n=8), manic patients (n=5) and depressive patients (n=5). The mRNA expression of chemokines and cytokines from U937 cells treated with BD patients plasma were different from those submitted to healthy controls plasma. Higher mRNA expression of IL-1 β was observed in those cells submitted to manic and depressive BD patients plasma when compared to euthymic patients. Also, depressive BD patients plasma induced higher expression of TNF- α compared to euthymic patients. However, chemokines expression, such as CXCL9 and CXCL10, were reduced in depressive BD patients. Inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α in bipolar manic and depressive patients demonstrate higher amounts of IL-1 β mRNA that euthymic patients and depressive patients induced higher amounts of TNF- α mRNA levels than the patients in euthymic U937. Since the expression of CXCL9 and CXCL10 chemokines in plasma from patients with depressive TB, proved less significant expression in the group of manic patients when compared to controls and euthymic bipolar patients.

Key words: Bipolar Disorder, polarized macrophages, neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- O papel hipotético de inflamação na patofisiologia da doença bipolar20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CXCL: quimiocinas

DAMPs: moléculas padrão associadas ao dano celular

EROS: espécies reativas de oxigênio

IFN: interferon

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase

M1: Ativação clássica de macrófagos

M2: Ativação alternativa de macrófagos

M-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos

MHC-II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (HLA-DR)

mRNA: RNA mensageiro

NK: natural killer

NKkB: fator nuclear kappa β

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RNA: Ácido Ribonucleico

SFB: Soro Fetal Bovino

STAT: Transdutores de Sinais e Ativadores da Transcrição

SCID: entrevista clínica estruturada para o DSM-IV

SNC: sistema nervoso central

TB: transtorno bipolar

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TH1: Linfócito T auxiliar tipo 1

TH2: Linfócito T auxiliar tipo 2

TLR4: receptores toll-like 4

TGF- β : fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : fator de necrose tumoral

U937: Linhagem humana de células monocíticas U937

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR	9
1.2 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR	11
1.3 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS NOS TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS	13
1.4 NEUROINFLAMAÇÃO E DESFECHOS CLÍNICOS	15
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 RECRUTAMENTO	20
4.2 A COLHEITA DE SANGUE E U-937 CULTURAS	20
4.3 ISOLAMENTO DE RNA E RT-QPCR	21
5 ARTIGO CIENTÍFICO	22
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
7 REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno psiquiátrico crônico, potencialmente grave e incapacitante, que representa uma importante questão de saúde pública. Caracteriza-se por episódios recorrentes de mania ou de hipomania e de depressão (não atribuíveis a substâncias ou a condições médicas), podendo ser subdividido em várias entidades diagnósticas segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-V): Transtorno Bipolar tipo I, Transtorno Bipolar tipo II, Transtorno Ciclotímico, Transtorno Bipolar induzido por substância/medicação, Transtorno Bipolar induzido por outra condição médica, Outros Transtornos Bipolares específicos e Transtorno Bipolar não-especificado. Os pacientes apresentam sintomas envolvendo alterações no humor, cognição e comportamento. Tem prevalência estimada de 0,6 a 1% para o TB tipo I e de 0,4 a 1,1 para o TB tipo II, dependendo da população estudada. A intensidade dos sintomas é variável, acarretando prejuízos no desempenho das atividades diárias e em sofrimento pessoal (1), (2). O TB é uma das maiores causas de incapacidade por doença, representando a sexta causa de anos perdidos por doença entre adultos jovens (1), (3).

Os episódios de mania são caracterizados por humor anormalmente elevado, expansivo ou irritável e aumento de atividade e de energia associado a três ou mais dos seguintes sintomas: autoestima aumentada ou grandiosidade, redução da necessidade de sono, aumento da quantidade de fala ou pressão para falar, fuga de ideias ou sensação de pensamentos acelerados, distraibilidade, aumento de atividades direcionadas a objetivos ou agitação psicomotora ou envolvimento excessivo em atividades potencialmente danosas. Os sintomas devem ter duração mínima de 7 dias (ou menos se necessária internação), causar significativo impacto no funcionamento social ou ocupacional, ou incluir sintomas psicóticos. Para o diagnóstico de hipomania, são necessários apenas 4 dias de duração e os sintomas não podem ser grave a ponto de motivar hospitalização ou incluir sintomas psicóticos.

Os episódios de depressão são caracterizados pela presença de ao menos cinco dos seguintes sintomas por um período de, no mínimo, duas semanas e representa marcada mudança em relação ao funcionamento prévio: humor deprimido, redução do interesse ou prazer, perda ou ganho significativo de peso (variação de ao menos 5%) ou aumento ou diminuição de apetite, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou sensação de perda de energia, sentimentos de desvalia ou culpa excessiva ou inapropriada, diminuição da capacidade de pensar ou se concentrar ou indecisão, pensamentos recorrentes em morte ou ideação suicida ou plano suicida ou tentativa de suicídio. Os sintomas devem causar marcado sofrimento ou impacto no funcionamento psicossocial.

O tratamento do TB envolve abordagem psicofarmacológica para a resolução de episódios agudos, tanto depressivos quanto maníacos/hipomaníacos, e para a manutenção da eutímia. O tratamento de manutenção visa a reduzir a recorrência dos episódios de humor e a estabelecer níveis ótimos de funcionalidade, tendo a psicoeducação um papel altamente relevante. A principal classe de fármacos utilizada no tratamento do TB é a dos estabilizadores de humor, em monoterapia ou em combinação. São também utilizados no tratamento antipsicóticos, benzodiazepínicos e, em casos selecionados, antidepressivos. Casos reservados podem necessitar estabilização dos sintomas com o uso de terapias de estimulação cerebral, sendo a mais estabelecida a eletroconvulsoterapia (2).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR

Estudos conduzidos em nosso laboratório têm mostrado alterações em alguns marcadores biológicos em sangue periférico de pacientes bipolares (4); (5),(6), (7), (8). Em particular, alterações em citocinas pró-inflamatórias foram encontradas durante episódios maníacos e depressivos (9). Níveis de TNF-alfa, por exemplo, estão aumentados nos estágios iniciais e tardios da doença, enquanto que os níveis de IL-6 encontram-se aumentados no início e diminuídos nos estágios tardios do TB (6). Os níveis de TNF- α e do seu receptor, o sTNFR1, também estavam aumentados em pacientes maníacos comparados aos eutímicos e indivíduos saudáveis (10). Similarmente ao que ocorre com as citocinas inflamatórias, fatores neurotróficos têm seus níveis alterados durante episódios de humor. Uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foi encontrado em pacientes bipolares durante os episódios agudos da doença (5), e ainda negativamente correlacionado com os escores de gravidade dos sintomas maníacos (4).

Barbosa e colaboradores (2010) observaram um aumento dos níveis plasmáticos de CCL11, CCL24 e CXCL10 em pacientes com TB quando comparados a controles saudáveis (11). A quimiocina CCL2 correlaciona-se positivamente com tempo de duração da doença e com a idade dos pacientes (11). Ademais, O'Brien e colaboradores (2006) observaram um aumento de CXCL8 e IL-6 em pacientes maníacos, enquanto que Brietzke e colaboradores (2009) encontraram um aumento dos níveis séricos de IL-4 e CXCL10 em pacientes eutímicos, quando comparados à indivíduos controle (12), (9). Cabe lembrar que as quimiocinas CC recrutam células mononucleares para os locais de inflamação crônica, enquanto as quimiocinas CXC atraem células polimorfonucleares, principalmente para os locais de inflamação aguda. As quimiocinas têm sido implicadas não só no recrutamento de leucócitos, mas também nos mecanismos que envolvem apoptose, angiogênese e neurogênese. No sistema nervoso central (SNC), as quimiocinas e os seus receptores podem ser encontrados na microglia e em neurônios do hipotálamo, núcleo acumbens, hipocampo, tálamo, córtex e cerebelo (13), (14), (15). As citocinas representam o sinal de comunicação entre os leucócitos. Quando induzida uma resposta do

sistema imune, a imunidade inata responde de forma rápida, com o recrutamento de monócitos e macrófagos, e liberação dos seus mediadores solúveis. Já na resposta adaptativa, a resposta é mais lenta, porém, mais específica, recrutando principalmente os linfócitos B e T (16).

Adicionalmente, parece existir um desequilíbrio entre estresse oxidativo e sistema de enzimas antioxidantes em pacientes com TB. Recentemente, um estudo conduzido por Rosa e col., (2014) mostraram que pacientes bipolares, ainda que em remissão, apresentam alterações nos níveis séricos de glutathione quando comparados a indivíduos saudáveis, e que estas alterações parecem estar associadas com a idade de início do transtorno (17). Outros autores tem também mostrado alterações em enzimas como SOD, catalase, glutathione peroxidase em pacientes com TB; tais alterações foram mais proeminentes durante os estágios avançados do transtorno (18). Baseado nestes achados, Kapczinski et al. (2010) desenvolveu um índice de toxicidade sistêmica, o qual indica que alterações nos níveis periféricos dos marcadores de estresse oxidativo, inflamação e neurotrofinas estão fortemente associadas com a fisiopatologia do TB. Corroborando com estas evidências, alterações cromossômicas, em especial, nos telômeros foi associado com transtornos de humor (19), (20), (21). Juntos, todos estes achados devem sinalizar para um aumentado dano celular, o que deve parcialmente explicar, a progressão da doença e, conseqüentemente o declínio cognitivo e funcional experimentado por pacientes com TB.

1.3 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS NOS TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS

No SNC, a microglia representa o primeiro sistema de defesa, sendo primeiramente ativada quando há a necessidade de reparo devido aos danos teciduais ou infecções (22). Estas pequenas células tem várias funções, incluindo o reconhecimento do patógeno, a fagocitose, a apresentação de antígeno e o remodelamento sináptico (23). A microglia não ativada, denominada "em repouso", está em constante vigília ao ambiente tecidual em que se encontra (24), (25). Quando ativada, em resposta à inflamação tecidual, as células microgliais tendem a alterar sua morfologia e conseqüentemente, a sua função (25).

Os macrófagos desempenham seu papel na imunidade inata como primeira linha de defesa, onde podem migrar e apresentar diferentes subtipos para neutralizar a inflamação. Os macrófagos são células de característica plástica, podendo ser estimulados a polarizar principalmente pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (FCM). Desta forma, os macrófagos podem ter mais de um tipo de ativação: a forma M1, induzida por linfócitos TH1 (IFN- β), é conhecida como ativação clássica e a forma M2 induzida por citocinas liberadas pelos linfócitos TH2 (IL-4), que representa a ativação alternativa (26), (27), (28), (29). De característica pró-inflamatória, o fenótipo M1 é induzido por lipolissacarídeo (LPS), INF- γ e TNF- α . Este fenótipo é caracterizado por produzir grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e citocinas inflamatórias (IL-12, IL-23, IL-1 β e TNF- α) e seu papel é mediar a resistência contra parasitas intracelulares e também tumores (30), (31), (28). Sabendo que INF- γ age por meio da ativação da sinalização dependente da JAK-STAT, a fosforilação do STAT1 e a conseqüente ativação da transcrição dos genes MHC-II, IL-12, dentre outros, promove uma resposta pró-inflamatória mediada pelos macrófagos (32). Ainda, sabemos que os macrófagos M1 sintetizam as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL10 e os receptores MHC-II, CD32, CD80, CD86 e CD68 (33), (34).

Já o fenótipo M2 desempenha um papel importante na reparação do remodelamento tecidual e progressão do tumor. Este fenótipo é dividido em três subgrupos: M2a, induzido por IL-4 ou IL-3 apresenta propriedades anti-inflamatórias e exibe a expressão da arginase 1, inibição do fator nuclear kappa B (NF κ B),

expressão aumentada de CD163, CD206 e receptores de fagocitose (35). A polarização para M2b que é estimulada por LPS ou por complexos imunes e ativada pela sinalização dependente dos receptores toll-like (TLRs) (36). A ativação para M2C, dependente da IL-10, IL-21 e de glicocorticoides que tem como função o remodelamento de tecidos e deposição de matriz extracelular (29), (33). Em resposta ao estímulo IL-4 e/ou IL-13, os macrófagos M2 podem diminuir o processo inflamatório através da produção de fatores anti-inflamatórios, tais como o fator de crescimento transformação (TGF- β), da IL-10, (29) e da alta produção de CCL13, CCL17 e fibronectina (30), (31). O recrutamento e a ativação de monócitos/macrófagos são processos importantes na resposta imune. Os fenótipos M1 e M2 são recrutados para os tecidos lesionados de um modo dependente de fase pró-inflamatória ou anti-inflamatória, podendo ainda existir uma possibilidade de interconversão do fenótipo M1 para M2.

1.4 NEUROINFLAMAÇÃO E DESFECHOS CLÍNICOS

Diferente da inflamação aguda, a neuroinflamação é uma resposta crônica, que é desencadeada através de estímulos inflamatórios persistentes. Em decorrência da inflamação crônica, os fatores que são liberados pela microglia juntamente com as moléculas padrão associadas ao dano celular (DAMPs) promovem dano ao tecido e propagam a inflamação, ocasionando prejuízos bioquímicos e funcionais sobre o SNC, como perda de sinapses, neurodegeneração e prejuízo cognitivo (37), (38). Além destes fatores, o aumento de TNF- α parece influenciar negativamente a arborização dendrítica, prejudicando assim a função cognitiva (39). Portanto, a resposta inflamatória inicial com a produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio representa o primeiro passo para a linha de defesa de redução do dano tecidual. Entretanto, quando não ocorre a transição adequada entre o fenótipo M1 ao M2, normalmente devido a uma baixa efetividade da ação anti-inflamatória, a presença contínua de agentes inflamatórios tornam o ambiente tóxico, provocando danos aos tecidos inflamados e morte celular (40), (41);(42).

Evidências tem demonstrado que a inflamação central exerce um papel importante na progressão das doenças neuropsiquiátricas, em especial, no TB. Por exemplo, Rao e colaboradores (2010) encontraram níveis significativamente maiores de RNAm de IL-1 β e do receptor seu receptor (IL-1R), do fator de diferenciação mielóide 88, fator nuclear-kappa B, marcadores astrogliais e microgliais no córtex pré-frontal de pacientes bipolares (37). Soederlund e colaboradores (2011) observaram um aumento de IL-1R no líquido cefalorraquidiano de pacientes hipo/maníacos em comparação a pacientes eutímicos (37); (43). Ademais, o lítio, um dos fármacos mais utilizados por pacientes bipolares, foi capaz de inibir significativamente a ativação da microglia induzida por LPS e a produção de citocinas pró-inflamatórias em ratos. Especula-se que os mecanismos pelo quais o lítio, exerceu os efeitos antiinflamatórios deva-se a supressão dos receptores toll-like 4 (TLR4) e da expressão das vias PI3K / Akt / FoxO1 (44).

Acredita-se que nos transtornos neuropsiquiátricos exista um remodelamento da microglia como uma tentativa de adaptação sináptica. A ativação da microglia tentaria lidar com a lesão neuronal em resposta a liberação de citocinas pró-inflamatórias e DAMPs. Em especial, no TB o acúmulo de episódios de humor deve

promover uma constante ativação da microglia e liberação exacerbada de citocinas, principalmente o TNF- α e IL-1 β . Por fim, a microglia ativada e a inflamação sistêmica devem causar um prejuízo na homeostase e reparação tecidual, causando neurotoxicidade (45), (22).

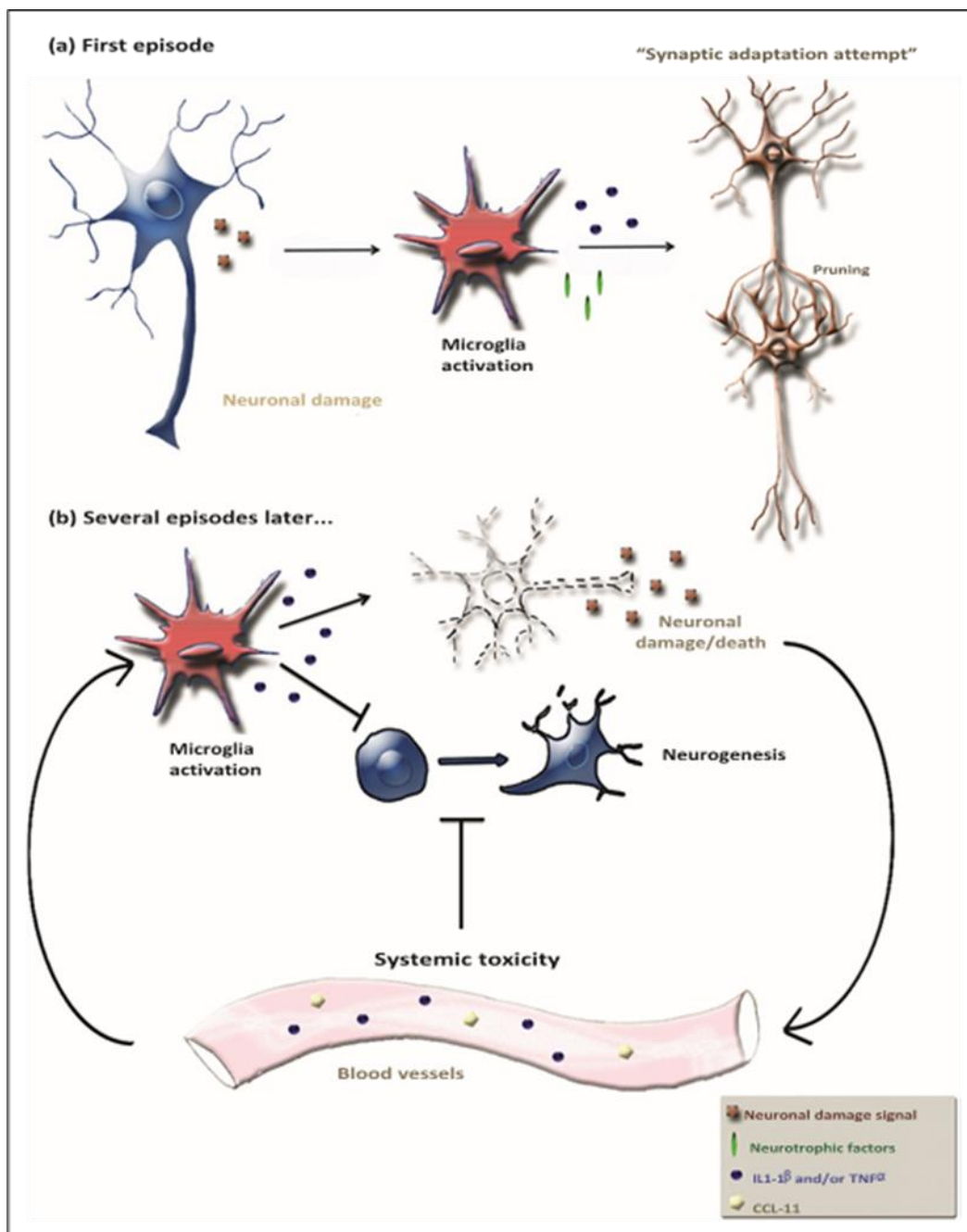


Figura 2: O papel hipotético de inflamação na fisiopatologia do TB. (a) Após o primeiro episódio agudo, lesão neuronal provoca a liberação de moléculas associadas a danos que por sua vez ativam a microglia. Microglia ativadas liberam citocinas pró-inflamatórias e ambos os fatores neurotróficos. Estas moléculas de induzir modificações do ambiente sináptica pela poda sináptica, numa "tentativa adaptação sináptica" para lidar com o insulto causado pelo episódio agudo. (b) Depois

de vários episódios, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, o que ultrapassa a capacidade de regulação para baixo do sistema, em resposta a uma indução aguda, mantém as microglia num estado constantemente ativado. A presença constante de fator de necrose tumoral TNF- α e IL - 1 β no meio extracelular inibe a neurogênese em neurónios danificados. Moléculas associadas com neuronal danos / morte ou falha do sistema de controle de feedback negativo potencialmente perpetuar toxicidade sistêmica. Ao mesmo tempo, inibe a neurogênese CCL11 e citocinas periféricas podem continuar a ativar as células microgliais (22).

Conforme descrito acima, diferentes abordagens sugerem uma forte relação entre o desequilíbrio imunológico e o TB. Por tanto, uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos nesta patologia seria útil para melhorar o conhecimento da fisiopatologia e desenvolver novas intervenções farmacológicas para o tratamento da doença (46). Dada a importância dos macrófagos no sistema imunitário e o possível envolvimento dele no TB,

2 JUSTIFICATIVA

Frente ao corpo de evidências crescentes das alterações do sistema imune dos pacientes com TB e também a escassez de estudos com a polarização de macrófagos nesta doença, justifica-se investigar o tipo de ativação gerado pelo sistema imune destes indivíduos. Isto permitiria entender melhor os mecanismos envolvidos com a fisiopatologia da doença e conseqüentemente contribuiria para a descoberta de novos alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a resposta fenotípica dos macrófagos contra o meio ambiente pró-inflamatória sistêmica observada no plasma de pacientes bipolares eutímicos, maníacos e depressivos em comparação aos controles.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão genica das quimionas CXCL9, CXCL10, citocinas IL-1 β , e dos fatores TNF- α , , TGF- β , e a relação STAR1/IL-10
- Avaliar a polarização dos fenótipos de macrófagos M1 e M2;

4 METODOLOGIA

4.1 RECRUTAMENTO

Os pacientes foram recrutados do Programa de Transtornos Bipolar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brasil). Todos os pacientes foram submetidos a uma entrevista clínica abrangente, por um psiquiatra, e o diagnóstico foi baseado na entrevista clínica estruturada para transtornos DSM-V Eixo I (SCID-I). Os critérios de inclusão foram diagnóstico de TB e a presença de um episódio maníaco, depressivo ou misto, de acordo com os critérios do DSM-V. Todos os pacientes receberam tratamento farmacológico de acordo com protocolos previamente estabelecidos.

Foram excluídos indivíduos com outros transtornos psiquiátricos que não o TB, ou em abuso atual de substâncias ilícitas, presença de doenças metabólicas como diabetes, doenças inflamatórias crônicas, câncer e outras condições médicas grave.

O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis selecionados a partir do grupo de voluntários no hospital, sem história atual de doença psiquiátrica ou história familiar de primeiro grau de doenças psiquiátricas ou ainda demência ou retardo mental. Estes indivíduos foram avaliados por uma entrevista segundo as normas do DSM-V, versão para indivíduos saudáveis. Os indivíduos eram, em geral, familiares de pessoas que usam outros estabelecimentos de saúde no mesmo hospital.

Este estudo foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito (que foi aprovado pelo comitê de ética local) após a natureza dos procedimentos terem sido explicada.

Os dados sociodemográficos e clínicos foram coletados em uma entrevista realizada com os pacientes. Sintomas maníacos e depressivos foram avaliados pela escala de Mania de Young (YMRS) (47) e pela escala de Avaliação de Depressão de Hamilton (HDRS-21), respectivamente. Funcionamento psicossocial foi avaliada pela escala de Avaliação Global do Funcionamento (GAF) (48).

4.2 A COLHEITA DE SANGUE E U-937 CULTURAS

Dez mililitros de sangue foi coletado por punção venosa e transferido tubos heparinizados, posteriormente centrifugados a 3000 g durante 10 minutos. O soro armazenado a -80 ° C até a utilização para o experimento. A linhagem celular U-937 (linfoma histiocítico humano) foi obtida a partir do Rio de Janeiro Cell Bank (www.bc.rj.org.br) e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal de

bovino inativado pelo calor (FBS) (Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), 100 U / mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina (Invitrogen) a 37 ° C em 5% de CO₂ humidificada de ar. A diferenciação da linhagem U937 em macrófagos foi realizada utilizando 10 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma Aldrich), durante 72 h, como mencionado acima. As células tratadas com PMA foram polarizados para mais 24 h de incubação com meio RPMI suplementado com 10% de plasma de cada paciente bipolar ou indivíduos saudáveis.

4.3 ISOLAMENTO DE RNA E RT-QPCR

O RNA total foi isolado a partir de L-polarizado 937 utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada com a M-MLV transcriptase reversa (Sigma-Aldrich) e nonâmeros aleatórios (Sigma-Aldrich) a partir de iniciadores de 1,2 mg de RNA. 2 uL de ADNc diluída (1:20), foi utilizado como modelo para reações de PCR com a polimerase Taq Platinum® (Life Technologies) num volume final de 20 ul. O perfil de ciclos térmicos para todos os genes foi um passo de desnaturação inicial a 94 ° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 15 s a 60 °C, 15 s a 72 °C durante a aquisição de dados. A especificidade da reação e a ausência de formação de dímeros de iniciadores foi avaliada utilizando análise de curva de fusão, no final de cada ensaio. Finalmente, confirmou-se a presença de uma única ampliação do tamanho, especificado por electroforese em gel de agarose. Todas as reações foram levadas a cabo num sistema em tempo real StepOnePlus® PCR (Applied Biosystems). Amostras rácios relativos foram calculados pelo método comparativo CT (método $\Delta\Delta$ CT) (Livak KJ, Schmittgen TD., 2001), quando normalizadas por genes de manutenção especificadas pelo programa GeNorm e calibradas pela média do Δ CT do grupo.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Submission Confirmation

3 mensagens

Brain, Behavior, and Immunity

17 de março de 2016

<ees.bbi.0.380404.1c04ed4e@eesmail.elsevier.com>

18:49

Para: adrianerrosa@gmail.com, emilygalvaos@gmail.com, adrianerrosa@hcpa.ufrgs.br

Cc: pa.ferraribm@gmail.com, mariana_parisi@yahoo.com.br, rcolombo1@ucs.br, matheusbeckerfreitas@gmail.com, gabrielrfries@gmail.com, bruna.ascoli@gmail.com, lu.p.gea@gmail.com, mksantanna@gmail.com, flavio.kapczinski@gmail.com, 00025267@ufrgs.br, fatima.guma@ufrgs.br, barbe.tuana@ufrgs.br

2014 IMPACT FACTOR: 5.889 / 2014 ISI RANKING: top 11% of all neuroscience journals (out of 252 neuroscience journals) and top 14% for all immunology journals (out of 148)

Re: Peripheral cytokines modulate macrophage polarization in bipolar disorder
Full Length Article

Dear Dr. Rosa,

Your manuscript entitled "Peripheral cytokines modulate macrophage polarization in bipolar disorder" has been received by Brain, Behavior, and Immunity. You may check on the review progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. You should receive a decision letter on the suitability of your manuscript for publication within 30 days. The URL is <http://ees.elsevier.com/bbi/>.

Your username is: adrianerrosa@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/bbi/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your research findings to Brain, Behavior, and Immunity.

Best regards,

Keith W. Kelley
Professor of Immunophysiology
University of Illinois
Editor-in-Chief
Brain, Behavior, and Immunity
BBIEditor@illinois.edu
<http://www.elsevier.com/locate/ybrbi/>
<http://ees.elsevier.com/bbi/>

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

adriane ribeiro rosa <adrianerrosa@gmail.com>

17 de março de 2016 18:55

Para: Pâmela Ferrari <pa.ferraribm@gmail.com>

Peripheral cytokine modulates macrophage polarization in bipolar disorder

Pamela Ferrari^{1,2*}; Mariana Migliorini Parisi^{3,4*}; Rafael Colombo^{1,2,5}; Matheus Becker^{4,7}, Gabriel Fries^{1,2}, Bruna Maria Ascoli^{1,2}, Luiza Paul Gêa^{1,2,5}, Márcia Kauer-Sant'anna^{1,2}, Flavio Kapczinski^{1,2}, Fábio Klamt^{4,7}, Fátima T.C.R. Guma^{4,8}, Adriane R Rosa^{**1,2,5}, Florencia M. Barbé-Tuana^{3,4}.

¹ Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil;

² Postgraduate Program: Psychiatry and Behavioral Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brazil;

³ Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil;

⁴ Postgraduate Program: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brazil;

⁵ Department of Pharmacology and Postgraduate Program: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

⁶ Laboratory of Pharmacology and Physiology, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Brazil;

⁷ Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brazil;

⁸ Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology of Lipids, Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, Porto Alegre (RS).

*These authors contributed equally to this work.

****Corresponding author:**

Adriane Ribeiro Rosa, Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Ramiro Barcelos 2350, Brazil. Email: adrianerosa@gmail.com

Abstract

Emerging evidence has shown a relationship between immune system dysfunction and BD. The aim of this work was to investigate the response of macrophages against the pro-inflammatory environment observed in plasma of bipolar patients. Patients that met the DSM-V criteria were recruited from Bipolar Disorder Program of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Manic and depressive symptoms were evaluated using the Young Mania Rating Scale (YMRS) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS-21), respectively. The study included 23 subjects divided into 4 groups. BD patients euthymic in remission (n=8); BD with depression (n=5); BD in the manic state (n=5) and control subjects (n=5). The human monocyte cell line U-937 was activated with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) and polarization was induced with RPMI-1640 media supplemented with 10% plasma from each patient for 24 h. Gene expression of selected M1 (IL-1 β , TNF- α , CXCL9, CXCL10 and STAT1) and M2 (CCL13, TGF- β and IL-10) markers was assessed by qPCR. Manic and depressive bipolar patients displayed an increase of IL-1 β and TNF- α compared to euthymic bipolar patients (6.40 ± 3.47 and 9.04 ± 5.84 versus 0.23 ± 0.11 ; $P < 0.05$). CXCL10 was reduced in both groups compared to euthymic. Depressive patients but not manic, showed a reduction in CXCL9 related to controls and euthymic patients. TGF- β was up-regulated in depressive and manic patients compared to controls. No difference was found in CCL13. We found a positive correlation between depressive symptoms and inflammatory markers. Therefore, the linear regression revealed that TNF- α expression was strongly related to depressive symptoms ($r^2 = 0.634$, $\beta = 0.634$, $P = 0.001$). Our results showed that peripheral cytokines may modulate M1/M2 polarization in BD. The evidence of macrophages as

source of inflammatory cytokines might be helpful to unravel how the mononuclear phagocyte system can be involved in the etiology of BD.

Keywords: Bipolar disorder, cytokines, chemokines, depression, macrophages, neuroinflammation, polarization, U-937, TNF- α .

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a highly disabling chronic psychiatric disease, characterized by recurrent episodes and has been associated with significant cognitive and functional impairment, even in remission periods (Watkins, Sawa, and Pomper 2014). BD is characterized by episodes of mania and depression interspersed with periods of remission and it has been associated with an increased prevalence of comorbidities and mortality (Fagiolini et al. 2013). The pathophysiology of this disease is not well understood. However several factors such as neurotrophins, oxidative stress and inflammation (Post 2007; Brietzke and Kapczinski 2008; Kauer-Sant'Anna et al. 2009) negatively influence the progression of individuals with BD.

In this context, a recent meta-analyses have demonstrated higher levels of some cytokines and soluble receptors in BD patients (Munkholm et al. 2012; Munkholm et al. 2013). A study conducted by Barboza and colleagues reported a higher ratio of interferon gamma (IFN- γ)/interleukin (IL)-4 and IFN- γ /IL-10 in patients, suggesting an immune imbalance towards a Th1 inflammatory profile (Barboza, Fonseca, and Viola 2014). Furthermore, BD patients have altered peripheral immune cells' phenotype. In this regard, circulating monocytes have up-regulated expression of inflammatory genes (Padmos et al. 2008), secrete greater amounts of IL-6 in response to lipopolysaccharide (LPS) (Kupka and Regeer 2007) and have limited ability of *in vitro* dendritic cell differentiation (Knijff et al. 2007).

Microglia are resident mononuclear phagocytes in the central nervous system (CNS) and share characteristics such as diversity and plasticity with macrophages (Becker et al. 2015). Classically activated microglia (M1) can produce inflammatory mediators that induce breakdown of the blood brain barrier which leads to massive infiltration of immune peripheral cells, contributing to neuronal damage. On the other hand, alternatively activated microglia (M2) can produce anti-inflammatory cytokines that inhibit M1 microglia-mediated neuroinflammation (Nakagawa and Chiba 2015; Réus et al. 2015; Beumer et al. 2012). The theory that peripheral macrophages may be involved in the pathophysiology of mood disorders has been initially proposed by Smith in 1992 in schizophrenic patients. It has been hypothesized that activated macrophages and T cells produce inflammatory mediators able to interfere with brain development, ultimately predisposing to psychiatric diseases (Smith 1992). Liu *et al.* demonstrated that patients with BD have an activated mononuclear system, as evidenced by elevated plasma levels of interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA) (Liu et al. 2004). Therefore, chronic activation of macrophages and their counterparts in the brain, the microglia, as observed in patients with BD, major depression and schizophrenia, may reflect a peripheral activation of the immune system and may be involved in the pathophysiology of mental disorders (Beumer et al. 2012).

Given that macrophages are central mediators of the innate immune response and initiate cell mediated immune responses, here we interrogate whether high amounts of circulating peripheral pro-inflammatory cytokines from BD patients could modulate the phenotype of macrophages. In this regard, the aim of this work was to investigate the *in vitro* phenotypic modulation response of macrophages supplemented with plasma from euthymic, manic, depressive BD patients' or healthy individuals.

2. *Material and methods*

2.1 *Subjects*

Patients were recruited from the Bipolar Disorders Program at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brazil). All participants underwent a comprehensive clinical interview by a psychiatrist and the diagnosis was based on the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I). Inclusion criteria were diagnosis of BD and presence of a manic, depressive or mixed episode at present according to DSM-IV-TR criteria. All patients received pharmacological treatment according to previously determined protocols. Exclusion criteria included DSM-IV diagnoses other than BD, current abuse of illicit substances and presence of metabolic disorders such as diabetes, chronic inflammatory diseases (e.g., inflammatory bowel disease or rheumatoid arthritis), cancer or other severe medical conditions.

The control group consisted of healthy subjects selected from the pool of volunteers at the hospital. They had no current or previous history and no first-degree family history of major psychiatric disorders, including dementia or mental retardation, assessed by the non-patient version of the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID). Control subjects were mostly family members of people using other healthcare facilities at the same hospital and were matched by frequency to the BD group according to age and gender.

This study was carried out in accordance with the latest version of the Declaration of Helsinki and reviewed by the Research Ethics Committee of Clinical Hospital of Porto Alegre. All participants provided written informed consent (which was approved by the local ethics committee) after the nature of the procedures had been fully explained.

2.2 Assessments

Patients with BD and healthy controls' socio-demographic and clinical data were collected in an extensive interview session. Manic and depressive symptoms were evaluated using the Young Mania Rating Scale (YMRS) and the Hamilton Depression Rating Scale, 21-item version (HDRS-21), respectively (Young et al. 1978; Williams 1988).

2.3 Blood collection and U-937 cultures

Ten milliliters of peripheral blood were drawn from outpatients by venipuncture into heparinized tubes and immediately centrifuged at 3,000xg for 10 min for plasma separation. Plasma was collected and stored at -80°C until use. U-937 monocytic cell line was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (www.bcrj.org.br) and maintained in RPMI-1640 media (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen) at 37°C in 5% CO₂ humidified air incubator. U-937 differentiation into macrophages was performed after stimulation with 10 nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Aldrich) for 72 h. After differentiation, media from macrophage-PMA treated cells was replaced and incubated for additional 24 h with fresh RPMI supplemented with 10% of plasma from each outpatient or healthy subject.

2.4 RNA Isolation and RT-qPCR

Total RNA was isolated from polarized U-937 using Trizol Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer instructions. Reverse transcription was performed with M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma-Aldrich) and random nonamers (Sigma-Aldrich) primers with 1.2 µg of RNA. 2 uL of diluted cDNA (1:20) was used as template for PCR

reactions with Platinum® Taq Polymerase (Life Technologies) in a final volume of 20 μ L with specific primers for CCL13, CXCL9, CXCL10, IL-1 β , IL-10, STAT1, TGF- β and TNF- α (Becker et al. 2015). The thermal cycling profile for all genes was an initial denaturation step at 94°C for 10 min followed by 40 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 60°C and 15 s at 72°C for data acquisition. Reaction specificity and absence of primer-dimer formation was evaluated using melting curve analysis at the end of each run. Finally, we confirmed the presence of a single amplicon of the specified size by agarose gel electrophoresis. All reactions were carried out in a StepOnePlus® real-time PCR system (Applied Biosystems). Samples relative ratios were calculated using the comparative CT method ($\Delta\Delta$ CT method) (Livak KJ, Schmittgen TD., 2001), normalized by the housekeeping genes (STAT1 and IL-10) specified by the GeNorm software (<https://genorm.cmgg.be>) and calibrated by the average of the Δ CT of the group.

2.5 Statistics

The statistical analysis was performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS v.19 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The four groups (healthy controls, euthymic, manic and depressive) were compared regarding clinical and socio-demographic characteristics using one-way analysis of variance (ANOVA) or chi-squared test, as appropriate.

Spearman correlations were used to evaluate the relationship between biological markers and clinical variables in each group of patients. Linear regression model was performed to test the predictors of mood symptoms. Overall cytokines that have been correlated with the mood symptoms were used as predictors in the linear regression model. All analyses were two-tailed, and significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

BD has been considered a disease associated with a systemic pro-inflammatory imbalance. To further define the inflammatory role in the pathophysiology of BD, we experimentally investigated the relative gene expression (relative to STAT1 and IL-10) of a panel of selected pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and chemokines in *in vitro* plasma-treated U-937 macrophages' cultures. Pro-inflammatory markers associated to the M1 phenotype such as IL-1 β , TNF- α , CXCL10 and CXCL9 showed different patterns of mRNA expression between the groups (Fig. 1 A-D). Manic and depressive bipolar patients displayed a similar and robust up-regulation of IL-1 β when compared with euthymic bipolar patients (6.40 ± 3.47 and 9.04 ± 5.84 versus 0.23 ± 0.11 ; $P < 0.002$ and $P = 0.000$, respectively). However, no difference was found between euthymic patients and healthy controls (0.23 ± 0.11 versus 0.28 ± 0.065 ; $P = 0.355$). Depressive bipolar patients induced an increased expression of TNF- α compared to healthy controls (2.23 ± 0.91 versus 0.60 ± 0.12 ; $P = 0.006$) and both, depressive and manic bipolar patients induced an increased expression of TNF- α compared to euthymic patients (2.23 ± 0.91 and 2.03 ± 0.45 versus 0.62 ± 0.24 ; $P = 0.002$ and $P = 0.004$, respectively). TNF- α expression was similar between healthy controls and euthymic patients (0.59 ± 0.11 versus 0.62 ± 0.24 ; $P > 0.05$). On the other hand, depressive bipolar patients displayed a down-regulation of CXCL9 expression related compared to healthy controls and euthymic patients (0.29 ± 0.20 versus 1.73 ± 1.17 and 1.86 ± 1.61 ; $P < 0.007$ and $P = 0.006$, respectively) and plasma from both depressive and manic patients induced a decrease of CXCL10 compared to euthymic patients (0.36 ± 0.15 and 0.86 ± 0.24 versus 1.83 ± 0.88 ; $P < 0.000$ and $P = 0.04$, respectively). Interestingly, healthy controls and euthymic patients were similar regarding CXCL9 (1.73 ± 1.17 versus

1.86 ± 1.61; P = 0.806) and CXCL10 (1.71 ± 0.66 versus 1.83 ± 0.88; P = 0.969) expression.

With regard to anti-inflammatory or regulatory regards to markers, depressive and manic bipolar patients displayed similar up-regulation of TGF- β when compared with healthy controls (1.50 ± 0.17 and 1.33 ± 0.27 versus 0.67 ± 0.11; P < 0.000 and P = 0.002, respectively) (Fig. 1E). Euthymic patients and healthy controls expressed similar amounts (0.81 ± 0.12 versus 0.67 ± 0.11 P = 0.275). No statistical significance (P = 0.061) was found for CCL13 expression among the groups (Fig. 1F).

We also found a positive correlation between HDRS scores and the levels of IL-1 β ($r^2 = 0.696$, P=0.001), TNF- α ($r^2 = 0.785$, P < 0.001), and TGF- β ($r^2 = 0.528$, P = 0.024), and a negative correlation between HDRS scores and CXCL10 ($r^2 = -0.551$, P = 0.018). Therefore, we performed a linear regression model using cytokines (e.g. IL-1 β and TNF- α) as independent factors, while the HDRS score was the dependent variable. Results from this model revealed that TNF- α gene up-regulation from stimulated macrophages of bipolar patients may contribute to the depressive symptoms found in BD ($r^2 = 0.634$, $\beta = 0.634$, t = 2.426, P = 0.001).

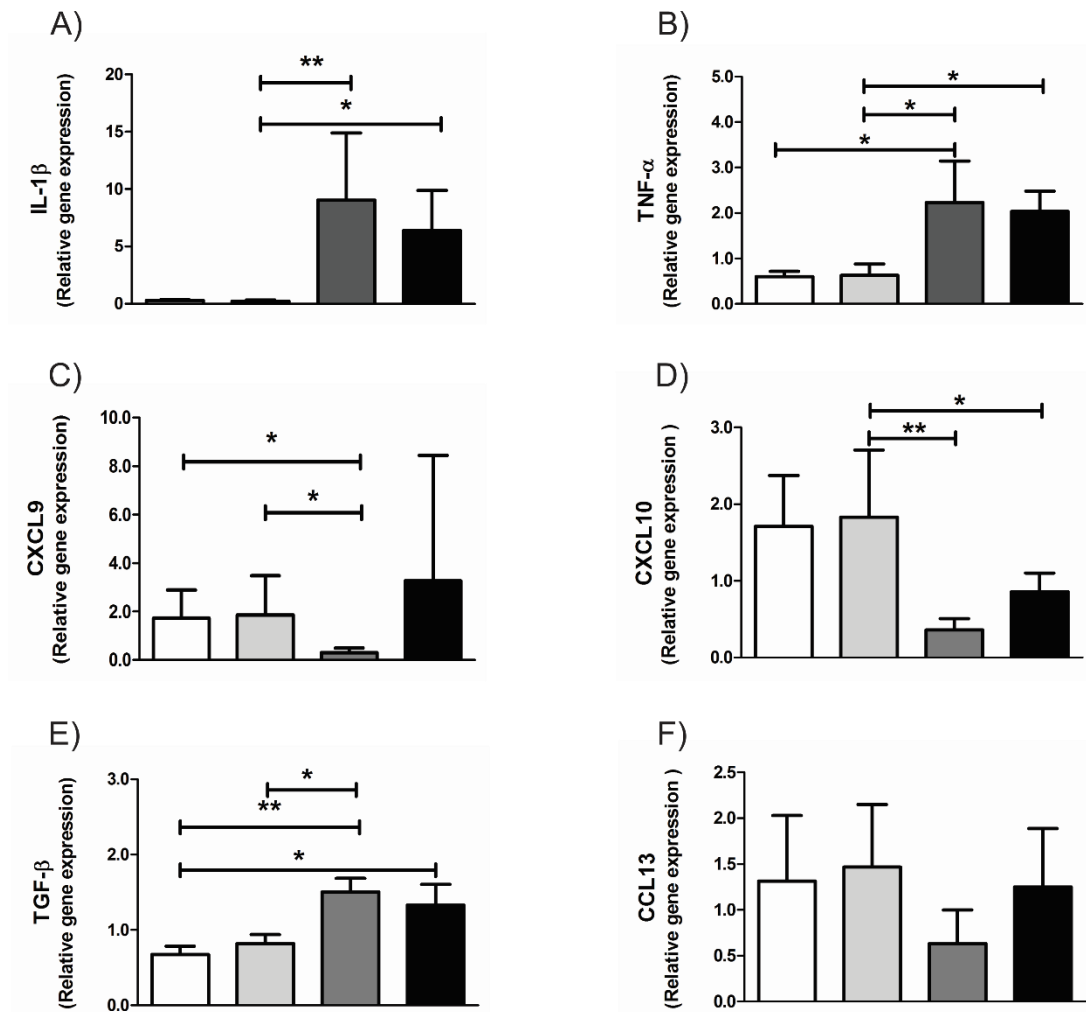


Figure 1

Gene expression of IL-1 β , TNF- α , CXCL9 and CXCL10 inflammatory (M1) and TGF- β and CCL13 regulatory (M2) cytokines and chemokines after *in vitro* polarization of U937 macrophages with plasma obtained from bipolar patients (n=18) and plasma from healthy individuals as a control group (n=5). Data expressed as mean \pm SD, Kruskal-Wallis test. * P < 0.05 and ** P < 0.001. White bars, Control group (n=5); Light grey bars: Euthymia group (n=8); Dark grey bars: Depression group (n=5); Black bars: Mania group (n=5).

Table A. Clinical and demographic characteristics of the participants.

	Control (n=5)	Euthymic (n=8)	Depression (n=5)	Mania (n=5)	P value
Gender, Male (%)	2(40%)	4(50%)	2(40%)	2(40%)	0.212 ^a
Age in years ^b	39.00±19.02	49.88±6.53	47.40±11.14	39.00±12.98	0.320 ^c
BMI (Kg/m ²)	26.54±6.75	30.81±5.93	28.27±7.38	24.85±1.93	0.408 ^c
Age at onset	--	34.50±7.72	43.00±10.19	37.00±13.58	0.368 ^c
HDRS	0.20±0.44	3.75±2.05	24.20±8.25	4.20±3.11	<0.001^c
YMRS	--	0.88±0.99	0.80±1.09	20.20±3.03	<0.001^c
Depressive episodes	--	9.38±10.46	5.40±5.55	2.20±4.38	<0.001^c
Manic episodes	--	7.25±6.06	8.75±12.97	4.20±3.49	0.655

HDRS, Hamilton Depression Rating Scale; YMRS, Young Mania Rating Scale; BMI, Body Mass Index. Bold indicates significant P values.

^aChi-square test.

^bMean (standard deviation).

^cANOVA.

4. DISCUSSION

BD is a prevalent non-communicable or chronic disease. However, underlying mechanisms of the bipolar disease etiology are still poorly understood. Previous studies have defined a critical role for peripheral inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-6, TNF- α (Munkholm et al. 2012; Munkholm et al. 2013), IL-1RA (Liu et al.

2004) and IFN- γ (Barboza, Fonseca, and Viola 2014) among others. Moreover, chronic systemic inflammation can compromise the integrity of the blood brain barrier, activate resident microglia and further propagate the inflammatory phenotype at the level of CNS. Whether these effects are important in the development of the bipolar disease was not well characterized.

Thus in the present study, we explored the hypothesis that an altered immune dysfunction observed in BD patients, lead to an imbalance towards an inflammatory M1 phenotype in macrophages. Our findings are in line with previous studies suggesting that augmented macrophage-derived cytokines such as TNF- α and IL1- β that modulated the phenotype of macrophages could also be involved with the development of the pathophysiology of BD (Munkholm et al. 2013; Fiedorowicz et al. 2015).

Even more interesting to note is that secretion of CXCL9 and CXCL10 chemokines from U-937 macrophages stimulated with plasma from depressive and manic patients are downregulated when compared with plasma from patients with euthymia or controls. These results raise substantial consideration and suggest that specific chemotaxis functions of the immune system might be compromised. CXCL10 is a potent chemoattractant of Th1 activated cells. Few studies had analyzed differential cytokines and chemokines in BD from different states. A recent study found higher plasma levels of CXCL10 in mania versus the euthymia state (Mota et al., 2013) or euthymia versus healthy individuals (Soderlund et al., 2011; Doganavsargil-Baysal 2013). However, we measured secreted CXCL10 after U-937 stimulation. Our results strength our tested hypothesis of macrophages as modulators of the pathological process and suggest a blunted immune response in BD patients in the depressive and mania state.

Emerging evidence has shown a relationship between immune system dysfunction and BD (Maes et al. 1991; Caruso et al. 1993; Brietzke et al. 2009; Tsai et al. 2012; do Prado et al. 2013). For instance, Fiedorowicz et al. (2015) observed an increase of TNF- α in the plasma of bipolar patients in manic phase, when compared with euthymia (Fiedorowicz et al. 2015). Likewise, O'Brien and colleagues showed that BD patients in mania and depression presented an increase in TNF- α concentration, when compared to healthy subjects (O'Brien et al. 2006). Munkholm et al. (2012) reported an increase in TNF- α levels and its soluble receptor (sTNFR1) in manic compared to healthy controls and euthymic patients (Munkholm et al. 2012). Despite of this evidence, these authors were unable to identify the source of these cytokines.

In our study, we suggest a critical role for macrophages as initiators or perpetuators of the systemic inflammation observed in bipolar patients during acute episodes (manic or depressive). Interestingly to note in our settings, macrophages activated with plasma from manic and depressive groups had a similar expression pattern of cytokines and chemokines secretion that was counterbalanced when individuals were in the euthymic phase and similar to controls.

One of the hypothesis involved in the inflammatory theory of BD is related to the chronic activation and desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), and related to the susceptibility of patients to stress (Fries et al. 2015). Chronic stress promotes a pronounced increase in cortisol content, which may attenuate the negative feedback exerted by this hormone on the HPA axis. The loss of the HPA axis homeostasis might promote a systemic increase of inflammatory cytokines with consequent spread of the inflammatory signal from the periphery to the CNS (Cervantes et al. 2001; Webster et al. 2002; Qi et al. 2013; Sinclair et al.

2013). Chronic microglial activation may lead to an elevated secretion of inflammatory cytokines resulting in neurotoxicity, supporting a susceptible state and synaptic remodeling in psychiatric disorders such as BD (Schroeter and Neumann 2011; Stertz, Magalhães, and Kapczinski 2013).

Furthermore, systemic inflammation in neuropsychiatric disorders has been linked to an increased production of glutamate, reactive oxygen species (ROS), reduced synthesis of serotonin, cytotoxicity and neuronal apoptosis (Okuda et al. 2004; Mateo 2008; Prager and Johnson 2009; Sorrells et al. 2009). Persistent CNS inflammation induces activation of the microglia with secretion of larger amounts of TNF- α and IL-1 β , that may lead to neuronal apoptosis and decreased neurotransmitter synthesis (Dantzer and Kalin 2009; Han and Yu 2014). In psychiatry, Torres-Platas et al. (2014) observed an increase in the number and activation of macrophages in the dorsal anterior cingulate from subjects with major depression (Torres-Platas et al. 2014). Additionally, another independent postmortem study showed a positive association between microglia activation and subjects who have committed suicide (Steiner et al. 2008).

However, these correlations between activation of macrophages and secretion do not determine causality or its biological function, which could be acting to induce inflammation or, as part of an amplification mechanism to promote inflammation. For instance, it could be possible that low grade systemic inflammation could compromise the integrity of the blood brain barrier even before diagnosis. Regardless of the small size of our sample, our linear regression analysis suggests that TNF- α secretion contributes to the development of depression and could be associated with the development or progression of the disease.

Resident macrophages or microglia respond to tissue damage, infection and presence of pathogens, with changes in morphology and function (Stertz, Magalhães, and Kapczinski 2013). Similar to peripheral macrophages (Becker et al. 2015) microglia polarization has distinct interconvertible phenotypes. M1 secretes pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α and M2 microglia has anti-inflammatory or regulatory activities characterized by the expression of IL-10 and TGF- β (Blank and Prinz 2013; Marshall et al. 2013; Franco and Fernández-Suárez 2015). Moreover, it has been suggested that the morphology and the phenotypic profile of microglia are involved in the cognitive and behavioral changes observed in neuropsychiatric disorders (Di Benedetto and Rupprecht 2013; Müller et al. 2015).

5. CONCLUSIONS

Our results demonstrate that cytokines from BD patients could modulate macrophages into an inflammatory M1 phenotype. Our data suggest a central role for macrophages in bipolar disease, as key cells in the initiation and/or propagation of the inflammatory milieu. Finally, our study demonstrates a contribution of TNF- α for the development of depression. In this regard, our results suggest that anti-TNF- α strategies already used in another clinical settings could be explored as a therapy in the treatment of depression or in the prevention of BD. Further studies should investigate the ability to polarize to M1 or M2 from monocyte of bipolar patients. A better understanding of the role of macrophage polarization on BD would allow us to identify new targets for the treatment of this disease.

Acknowledgments

Mariana M. Parisi is recipient of scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Florencia M Barbé-Tuana and

Bruna M Ascoli are scholarship recipients from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Adriane R Rosa would like to thank the support of the CNPq.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest

The authors of this paper do not have any commercial associations that might pose a conflict of interest in connection with this manuscript. Flávio Kapczinski has received grant/research support from Astra-Zeneca, Eli Lilly, Janssen-Cilag, Servier, CNPq, CAPES, NARSAD and Stanley Medical Research Institute; has been a member of the board of speakers for Astra-Zeneca, Eli Lilly, Janssen and Servier; and has served as a consultant for Servier.

6. REFERENCES

Barboza, Bianca A., Bruna P. F. Fonseca, and João P. B. Viola. 2014. "NFAT1

Transcription Factor in Dendritic Cells Is Required to Modulate T Helper Cell Differentiation." *Immunobiology* 219 (9): 704–12.

doi:10.1016/j.imbio.2014.05.001.

Becker, Matheus, Marco A. De Bastiani, Mariana M. Parisi, Fátima T. C. R. Guma,

Melissa M. Markoski, Mauro A. A. Castro, Mark H. Kaplan, Florencia M. Barbé-Tuana, and Fábio Klamt. 2015. "Integrated Transcriptomics Establish

Macrophage Polarization Signatures and Have Potential Applications for Clinical Health and Disease.” *Scientific Reports* 5: 13351. doi:10.1038/srep13351.

Beumer, Wouter, Sinead M. Gibney, Roosmarijn C. Drexhage, Lorena Pont-Lezica, Janine Doorduyn, Hans C. Klein, Johann Steiner, et al. 2012. “The Immune Theory of Psychiatric Diseases: A Key Role for Activated Microglia and Circulating Monocytes.” *Journal of Leukocyte Biology* 92 (5): 959–75. doi:10.1189/jlb.0212100.

Blank, Thomas, and Marco Prinz. 2013. “Microglia as Modulators of Cognition and Neuropsychiatric Disorders.” *Glia* 61 (1): 62–70. doi:10.1002/glia.22372.

Brietzke, Elisa, and Flávio Kapczinski. 2008. “TNF-Alpha as a Molecular Target in Bipolar Disorder.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32 (6): 1355–61. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.01.006.

Brietzke, Elisa, Laura Stertz, Brisa Simões Fernandes, Marcia Kauer-Sant’anna, Marcello Mascarenhas, Andréia Escosteguy Vargas, José Artur Chies, and Flávio Kapczinski. 2009. “Comparison of Cytokine Levels in Depressed, Manic and Euthymic Patients with Bipolar Disorder.” *Journal of Affective Disorders* 116 (3): 214–17. doi:10.1016/j.jad.2008.12.001.

Caruso, A., L. Tiberio, C. De Rango, C. Bonfanti, G. Flamminio, G. Gribaudo, E. Monti, E. Viani, N. Manca, and G. Garotta. 1993. “A Monoclonal Antibody to the NH2-Terminal Segment of Human IFN-Gamma Selectively Interferes with the Antiproliferative Activity of the Lymphokine.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 150 (3): 1029–35.

- Cervantes, P., S. Gelber, F. N. Kin, V. N. Nair, and G. Schwartz. 2001. "Circadian Secretion of Cortisol in Bipolar Disorder." *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 26 (5): 411–16.
- Dantzer, Robert, and Ned Kalin. 2009. "Salivary Biomarkers of Stress: Cortisol and Alpha-Amylase." *Psychoneuroendocrinology* 34 (1): 1.
doi:10.1016/j.psyneuen.2008.11.002.
- Di Benedetto, B., and R. Rupprecht. 2013. "Targeting Glia Cells: Novel Perspectives for the Treatment of Neuropsychiatric Diseases." *Current Neuropharmacology* 11 (2): 171–85. doi:10.2174/1570159X11311020004.
- do Prado, Carine Hartmann, Lucas Bortolotto Rizzo, Andréa Wieck, Rodrigo Pestana Lopes, Antonio L. Teixeira, Rodrigo Grassi-Oliveira, and Moisés Evandro Bauer. 2013. "Reduced Regulatory T Cells Are Associated with Higher Levels of Th1/TH17 Cytokines and Activated MAPK in Type 1 Bipolar Disorder." *Psychoneuroendocrinology* 38 (5): 667–76.
doi:10.1016/j.psyneuen.2012.08.005.
- Doganavsargil-Baysal O, Cinemre B, Aksoy UM, Akbas H, Metin O, Fettahoglu C, Gokmen Z, Davran F. Levels of TNF- α , soluble TNF receptors (sTNFR1, sTNFR2), and cognition in bipolar disorder. *Hum Psychopharmacol*. 2013 Mar;28(2):160-7.
- Fagiolini, Andrea, Rocco Forgione, Mauro Maccari, Alessandro Cuomo, Benedetto Morana, Mario Catena Dell'Osso, Francesca Pellegrini, and Alessandro Rossi. 2013. "Prevalence, Chronicity, Burden and Borders of Bipolar Disorder." *Journal of Affective Disorders* 148 (2-3): 161–69. doi:10.1016/j.jad.2013.02.001.

- Fiedorowicz, Jess G., Alan R. Prossin, Casey P. Johnson, Gary E. Christensen, Vincent A. Magnotta, and John A. Wemmie. 2015. "Peripheral Inflammation during Abnormal Mood States in Bipolar I Disorder." *Journal of Affective Disorders* 187 (November): 172–78. doi:10.1016/j.jad.2015.08.036.
- Franco, Rafael, and Diana Fernández-Suárez. 2015. "Alternatively Activated Microglia and Macrophages in the Central Nervous System." *Progress in Neurobiology* 131 (August): 65–86. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.003.
- Fries, Gabriel Rodrigo, Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno, Carolina Gubert, Bárbara Tietböhl Martins Quadros dos Santos, Juliana Sartori, Bárbara Eisele, Pamela Ferrari, et al. 2015. "Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction and Illness Progression in Bipolar Disorder." *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 18 (1). doi:10.1093/ijnp/pyu043.
- Han, Qiu-Qin, and Jin Yu. 2014. "Inflammation: A Mechanism of Depression?" *Neuroscience Bulletin* 30 (3): 515–23. doi:10.1007/s12264-013-1439-3.
- Jones, S. H., G. Thornicroft, M. Coffey, and G. Dunn. 1995. "A Brief Mental Health Outcome Scale-Reliability and Validity of the Global Assessment of Functioning (GAF)." *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 166 (5): 654–59.
- Kauer-Sant'Anna, Marcia, Flávio Kapczinski, Ana C. Andreazza, David J. Bond, Raymond W. Lam, L. Trevor Young, and Lakshmi N. Yatham. 2009. "Brain-Derived Neurotrophic Factor and Inflammatory Markers in Patients with Early-

vs. Late-Stage Bipolar Disorder.” *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 12 (4): 447–58.
doi:10.1017/S1461145708009310.

Knijff, Esther M., M. Nadine Breunis, Ralph W. Kupka, Harm J. de Wit, Cindy Ruwhof, Grard W. Akkerhuis, Willem A. Nolen, and Hemmo A. Drexhage. 2007. “An Imbalance in the Production of IL-1beta and IL-6 by Monocytes of Bipolar Patients: Restoration by Lithium Treatment.” *Bipolar Disorders* 9 (7): 743–53.
doi:10.1111/j.1399-5618.2007.00444.x.

Kupka, R. W., and E. J. Regeer. 2007. “[Bipolar mood disorders].” *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde* 151 (41): 2256–60.

Liu, Hsing-Cheng, Yi-Yuan Yang, Yech-Mei Chou, Kun-Po Chen, Winston W. Shen, and Sy-Jye Leu. 2004. “Immunologic Variables in Acute Mania of Bipolar Disorder.” *Journal of Neuroimmunology* 150 (1-2): 116–22.
doi:10.1016/j.jneuroim.2004.01.006.

Maes, M., E. Bosmans, E. Suy, B. Minner, and J. Raus. 1991. “A Further Exploration of the Relationships between Immune Parameters and the HPA-Axis Activity in Depressed Patients.” *Psychological Medicine* 21 (2): 313–20.

Marshall, S. Alex, Justin A. McClain, Matthew L. Kelso, Deann M. Hopkins, James R. Pauly, and Kimberly Nixon. 2013. “Microglial Activation Is Not Equivalent to Neuroinflammation in Alcohol-Induced Neurodegeneration: The Importance of Microglia Phenotype.” *Neurobiology of Disease* 54 (June): 239–51.
doi:10.1016/j.nbd.2012.12.016.

- Mateo, Jill M. 2008. "Inverted-U Shape Relationship between Cortisol and Learning in Ground Squirrels." *Neurobiology of Learning and Memory* 89 (4): 582–90. doi:10.1016/j.nlm.2007.11.002.
- Mota R, Gazal M, Acosta BA, de Leon PB, Jansen K, Pinheiro RT, Souza LD, Silva RA, Oses JP, Quevedo L, Lara DR, Ghisleni G, Kaster MP. Interleukin-1 β is associated with depressive episode in major depression but not in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2013 Dec;47(12):2011-4.
- Müller, Annett, Susan Brandenburg, Kati Turkowski, Susanne Müller, and Peter Vajkoczy. 2015. "Resident Microglia, and Not Peripheral Macrophages, Are the Main Source of Brain Tumor Mononuclear Cells." *International Journal of Cancer* 137 (2): 278–88. doi:10.1002/ijc.29379.
- Munkholm, Klaus, Julie Vestergaard Braüner, Lars Vedel Kessing, and Maj Vinberg. 2013. "Cytokines in Bipolar Disorder vs. Healthy Control Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Psychiatric Research* 47 (9): 1119–33. doi:10.1016/j.jpsychires.2013.05.018.
- Munkholm, Klaus, Maj Vinberg, Michael Berk, and Lars Vedel Kessing. 2012. "State-Related Alterations of Gene Expression in Bipolar Disorder: A Systematic Review." *Bipolar Disorders* 14 (7): 684–96. doi:10.1111/bdi.12005.
- Nakagawa, Yutaka, and Kenji Chiba. 2015. "Diversity and Plasticity of Microglial Cells in Psychiatric and Neurological Disorders." *Pharmacology & Therapeutics* 154 (October): 21–35. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.06.010.

O'Brien, Sinead M., Paul Scully, Lucinda V. Scott, and Timothy G. Dinan. 2006.

“Cytokine Profiles in Bipolar Affective Disorder: Focus on Acutely Ill Patients.”

Journal of Affective Disorders 90 (2-3): 263–67. doi:10.1016/j.jad.2005.11.015.

Okuda, Kazuhiro, Manabu Momose, Masashi Murata, Yoshinori Saito, Masukazu Inoie, Chikara Shinohara, Larry F. Wolff, and Hiromasa Yoshie. 2004.

“Treatment of Chronic Desquamative Gingivitis Using Tissue-Engineered Human Cultured Gingival Epithelial Sheets: A Case Report.” *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 24 (2): 119–25.

Padmos, Roos C., Manon H. J. Hillegers, Esther M. Knijff, Ronald Vonk, Anne Bouvy,

Frank J. T. Staal, Dick de Ridder, Ralph W. Kupka, Willem A. Nolen, and

Hemmo A. Drexhage. 2008. “A Discriminating Messenger RNA Signature for Bipolar Disorder Formed by an Aberrant Expression of Inflammatory Genes in Monocytes.” *Archives of General Psychiatry* 65 (4): 395–407.

doi:10.1001/archpsyc.65.4.395.

Post, Robert M. 2007. “Role of BDNF in Bipolar and Unipolar Disorder: Clinical and Theoretical Implications.” *Journal of Psychiatric Research* 41 (12): 979–90.

doi:10.1016/j.jpsychires.2006.09.009.

Prager, Eric M., and Luke R. Johnson. 2009. “Stress at the Synapse: Signal

Transduction Mechanisms of Adrenal Steroids at Neuronal Membranes.”

Science Signaling 2 (86): re5. doi:10.1126/scisignal.286re5.

Qi, Xin-Rui, Willem Kamphuis, Shanshan Wang, Qian Wang, Paul J. Lucassen,

Jiang-Ning Zhou, and Dick F. Swaab. 2013. “Aberrant Stress Hormone Receptor Balance in the Human Prefrontal Cortex and Hypothalamic Paraventricular

Nucleus of Depressed Patients.” *Psychoneuroendocrinology* 38 (6): 863–70.
doi:10.1016/j.psyneuen.2012.09.014.

Réus, G. Z., G. R. Fries, L. Stertz, M. Badawy, I. C. Passos, T. Barichello, F. Kapczinski, and J. Quevedo. 2015. “The Role of Inflammation and Microglial Activation in the Pathophysiology of Psychiatric Disorders.” *Neuroscience* 300 (August): 141–54. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.018.

Schroeter, Matthias L., and Jane Neumann. 2011. “Combined Imaging Markers Dissociate Alzheimer’s Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration - An ALE Meta-Analysis.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 3: 10.
doi:10.3389/fnagi.2011.00010.

Söderlund J, Olsson SK, Samuelsson M, Walther-Jallow L, Johansson C, Erhardt S, Landén M, Engberg G. Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-1 β in bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2011 Mar;36(2):114-8.

Sinclair, Duncan, Stu G. Fillman, Maree J. Webster, and Cynthia Shannon Weickert. 2013. “Dysregulation of Glucocorticoid Receptor Co-Factors FKBP5, BAG1 and PTGES3 in Prefrontal Cortex in Psychotic Illness.” *Scientific Reports* 3: 3539.
doi:10.1038/srep03539.

Smith, R. S. 1992. “A Comprehensive Macrophage-T-Lymphocyte Theory of Schizophrenia.” *Medical Hypotheses* 39 (3): 248–57.

Sorrells, Shawn F., Javier R. Caso, Carolina D. Munhoz, and Robert M. Sapolsky. 2009. “The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation.” *Neuron* 64 (1): 33–39. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.032.

- Steiner, Johann, Hendrik Biela, Ralf Brisch, Peter Danos, Oliver Ullrich, Christian Mawrin, Hans-Gert Bernstein, and Bernhard Bogerts. 2008. "Immunological Aspects in the Neurobiology of Suicide: Elevated Microglial Density in Schizophrenia and Depression Is Associated with Suicide." *Journal of Psychiatric Research* 42 (2): 151–57. doi:10.1016/j.jpsychires.2006.10.013.
- Stertz, Laura, Pedro V. S. Magalhães, and Flávio Kapczinski. 2013. "Is Bipolar Disorder an Inflammatory Condition? The Relevance of Microglial Activation." *Current Opinion in Psychiatry* 26 (1): 19–26. doi:10.1097/YCO.0b013e32835aa4b4.
- Torres-Platas, Susana G., Samuel Comeau, Adeline Rachalski, Gregory Dal Bo, Cristiana Cruceanu, Gustavo Turecki, Bruno Giros, and Naguib Mechawar. 2014. "Morphometric Characterization of Microglial Phenotypes in Human Cerebral Cortex." *Journal of Neuroinflammation* 11: 12. doi:10.1186/1742-2094-11-12.
- Tsai, Shang-Ying, Kuo-Hsuan Chung, Jui-Yu Wu, Chian-Jue Kuo, Hsin-Chien Lee, and Shou-Hung Huang. 2012. "Inflammatory Markers and Their Relationships with Leptin and Insulin from Acute Mania to Full Remission in Bipolar Disorder." *Journal of Affective Disorders* 136 (1-2): 110–16. doi:10.1016/j.jad.2011.08.022.
- Watkins, C. C., A. Sawa, and M. G. Pomper. 2014. "Glia and Immune Cell Signaling in Bipolar Disorder: Insights from Neuropharmacology and Molecular Imaging to Clinical Application." *Translational Psychiatry* 4: e350. doi:10.1038/tp.2013.119.
- Webster, M. J., M. B. Knable, J. O'Grady, J. Orthmann, and C. S. Weickert. 2002. "Regional Specificity of Brain Glucocorticoid Receptor mRNA Alterations in

Subjects with Schizophrenia and Mood Disorders.” *Molecular Psychiatry* 7 (9): 985–94, 924. doi:10.1038/sj.mp.4001139.

Williams, J. B. 1988. “A Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale.” *Archives of General Psychiatry* 45 (8): 742–47.

Young, R. C., J. T. Biggs, V. E. Ziegler, and D. A. Meyer. 1978. “A Rating Scale for Mania: Reliability, Validity and Sensitivity.” *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 133 (November): 429–35.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas evidências sugerem uma relação entre a ativação do sistema imune, a neuroinflamação e a neuroprogressão do TB (9), (49). No nosso trabalho, avaliamos a expressão de citocinas e quimiocinas em macrófagos da linhagem U937, que foram tratados com soro de pacientes bipolares, e após isso, induzidos para a diferenciação para os fenótipos M1 e/ou M2. Não foi observada diferença significativa quanto aos dados demográficos, como sexo, idade e escolaridade entre os grupos. A expressão da IL-1 β estava maior em pacientes bipolares maníacos e depressivos quando comparados aos pacientes eutímicos, assim como a expressão de TNF- α , que estava significativamente aumentada nos bipolares deprimidos quando comparado aos eutímicos.

A disfunção do sistema imune no TB é apontada como um dos possíveis mecanismos envolvidos com a neuroprogressão do TB (50), (51), (52). Barbosa e colaboradores (2014) observaram um aumento dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β , proteína C-reativa, TNFR1 e IL-6 em soro de pacientes com TB quando comparados com controles (50). Doganavsargil-Baysal e colaboradores (2013) encontraram uma correlação negativa entre marcadores inflamatórios, tais como o TNF- α , RFNT1s e RFNT2s, com a função cognitiva, demonstrando uma relação entre a inflamação sistêmica e o prejuízo cognitivo dos pacientes (53). Munkholm e colaboradores (2013) encontraram um aumento de TNF- α no soro de pacientes maníacos quando comparados à controles saudáveis, bem como a elevação do mesmo marcador em pacientes maníacos comparado com pacientes eutímicos (54). Ainda, Fiedorowicz e colaboradores (2015), em um estudo caso-controle, encontraram valores elevados de TNF- α em pacientes bipolares. Junto com estes estudo prévios, nossos achados apontam que o TB está associado com uma ativação do sistema imune (55).

Observamos uma diminuição na expressão da quimiocina CXCL9 no grupo de bipolares deprimidos, assim como na expressão da quimiocina CXCL10 nos deprimidos e maníacos. Estas duas quimiocinas fazem parte da subfamília das CXC, classificadas com base na presença ou ausência de uma sequência de aminoácidos, ácido glutâmico-arginina-leucina, sendo denominadas positivas ou negativas. As quimiocinas que apresentam esta sequência, como a CXCL10 e CXCL9, são promotoras potentes de angiogênese e ainda, são primordiais para atrair leucócitos

natural killer (NK), linfócitos T e também os monócitos para locais de inflamação (56),(57), (58). Ainda, observamos um aumento na expressão do TGF- β no soro dos pacientes depressivos e maníacos. A ação dos macrófagos é fortemente regulada por várias citocinas, e também pelos fatores de crescimento, tais como o TGF- β (51). Esses achados indicam um quadro de inflamação sistêmica bem estabelecido no TB, especialmente marcado durante os episódios agudos da doença.

É importante salientar que além da inflamação sistêmica, os pacientes com TB também apresentam neuroinflamação. Em um estudo atual, Rolstad e colaboradores (2015), averiguaram níveis elevados do marcador microglial YKL-40, um marcador de diferenciação de macrófagos. Além disso, mostraram aumento da ativação microglial no líquido cefalorraquidiano de pacientes com TB. Associado ao aumento do YKL-40, notou-se uma piora na função cognitiva e executiva. Sabe-se que a microglia exerce papel fundamental na propagação do sinal inflamatório para o SNC (59). A ativação da micróglia dá-se através da liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-4, que ultrapassam a barreira hematoencefálica através do plexo coróide e de canais de transporte (60), (45), (61), ativando a microglia. Lembrando que a microglia polariza-se apresentando dois fenótipos principais, o M1, onde a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e o TNF- α estão aumentadas; e o fenótipo M2, com ação anti-inflamatória e caracterizada por aumento na síntese e liberação de citocinas como a IL-10 e o TGF- β (25), (34). No TB ainda são escassos os trabalhos com a polarização da microglia, porém, a sua ativação crônica aumenta a produção de citocinas inflamatórias, provavelmente contribuindo para uma maior suscetibilidade a novos episódios (43), (22).

A ativação crônica da microglia faz com que haja uma elevação do estresse oxidativo, diminuição de neurotrofinas, apoptose neuronal e reorganização celular, reduzindo a neuroplasticidade e a neurogênese (22). Em um estudo post-mortem de pacientes com TB, os níveis de IL-1 β e NF-K β , marcadores de caráter pró-inflamatório, encontraram-se elevados no córtex pré-frontal, área relacionada com a função executiva, atenção e controle cognitivo (37). Monfrim e colaboradores (2014), observaram níveis sistêmicos mais elevados de IL-1b em pacientes com TB, e este aumento esteve associado com um aumento do risco de suicídio (62). Em outros transtornos psiquiátricos, como na depressão, vem sendo demonstrado o aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN e o TNF- α (63),.

(64). Assim como Song et al. (2009), que observaram um aumento de IL-1 β e uma diminuição da citocina IL-10 em soro de pacientes com depressão, citocina que contribui para a tentativa de homeostase (65).

Um das áreas promissoras para a análise da inflamação central e ativação da microglia são os estudos com neuroimagem. A ativação exacerbada do hipocampo, foi observado em indivíduos com TB, levando a acreditar que a neuroinflamação estaria diretamente relacionada com um dano desta região, prejudicando a cognição, aprendizagem e memória destes indivíduos (66). Levando em consideração a função da microglia e dos seus possíveis diferentes fenótipos em situação de homeostase e doença, uma maior ativação para o fenótipo M1 deve estar relacionado com as alterações neuroanatômicas e com um pior prognóstico da doença (22).

No nosso estudo, a expressão aumentada de TNF- α , no grupo de pacientes deprimidos e o aumento da expressão da IL-1 β , sugere que o fenótipo M1 seja predominante nos pacientes com TB. Ainda, acreditamos que a inflamação sistêmica e central desempenhe um papel na fisiopatologia e progressão do TB.

Resumidamente, a ativação crônica da microglia pode levar ao aumento da produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , resultando numa toxicidade para o SNC, tornando-o mais suscetível para a remodelação sináptica em desordens psiquiátricas, tais como TB (43), (22).

Em conclusão, nossos resultados mostraram que as citocinas sistêmicas são capazes de modular o genótipo macrófagos de polarização M1 / M2 no TB. A evidência de macrófagos como fonte de citocinas inflamatórias pode ser útil para desvendar a forma como o sistema fagocitário mononuclear pode estar envolvido na etiologia dos episódios de humor em TB.

7 REFERÊNCIAS

1. Gore FM, Bloem PJN, Patton GC, Ferguson J, Joseph V, Coffey C, et al. Global burden of disease in young people aged 10-24 years: a systematic analysis. *Lancet Lond Engl*. 2011 Jun 18;377(9783):2093–102.
2. Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar Disord*. 2013 Feb;15(1):1–44.
3. Catala-Lopez F, Garcia-Altes A, Alvarez-Martin E, Genova-Maleras R, Morant-Ginestar C. [Economic evaluation of neurological and mental disorders in Spain: systematic review and comparative analysis]. *Rev Neurol*. 2011 Jan 16;52(2):65–71.
4. Cunha ABM, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 2006 May 8;398(3):215–9.
5. Tramontina JF, Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neurosci Lett*. 2009 Mar 13;452(2):111–3.
6. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol Off Sci J Coll Int Neuropsychopharmacol CINP*. 2009 May;12(4):447–58.
7. Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy Vargas A, et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2009 Aug;116(3):214–7.
8. Kunz M, Ceresér KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Rev Bras Psiquiatr São Paulo Braz* 1999. 2011 Sep;33(3):268–74.
9. Brietzke E, Kauer-Sant'Anna M, Teixeira AL, Kapczinski F. Abnormalities in serum chemokine levels in euthymic patients with bipolar disorder. *Brain Behav Immun*. 2009 Nov;23(8):1079–82.
10. Munkholm K, Vinberg M, Berk M, Kessing LV. State-related alterations of gene expression in bipolar disorder: a systematic review. *Bipolar Disord*. 2012 Nov;14(7):684–96.
11. Barbosa IG, Huguet RB, Mendonça VA, Neves FS, Reis HJ, Bauer ME, et al. Increased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with long-term bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2010 May 14;475(2):95–8.
12. O'Brien SM, Scully P, Scott LV, Dinan TG. Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Disord*. 2006 Feb;90(2-3):263–7.
13. Adler MW, Rogers TJ. Are chemokines the third major system in the brain? *J Leukoc Biol*. 2005 Dec;78(6):1204–9.

14. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):610–21.
15. Gonzalez-Perez O, Jauregui-Huerta F, Galvez-Contreras AY. Immune system modulates the function of adult neural stem cells. *Curr Immunol Rev*. 2010 Aug 1;6(3):167–73.
16. Sperner-Unterweger B. Immunological aetiology of major psychiatric disorders: evidence and therapeutic implications. *Drugs*. 2005;65(11):1493–520.
17. Rosa AR, Singh N, Whitaker E, de Brito M, Lewis AM, Vieta E, et al. Altered plasma glutathione levels in bipolar disorder indicates higher oxidative stress; a possible risk factor for illness onset despite normal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Psychol Med*. 2014 Aug;44(11):2409–18.
18. Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord*. 2008 Dec;111(2-3):135–44.
19. Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, et al. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry*. 2006 Sep 1;60(5):432–5.
20. Elvsåshagen T, Vera E, Bøen E, Bratlie J, Andreassen OA, Josefsen D, et al. The load of short telomeres is increased and associated with lifetime number of depressive episodes in bipolar II disorder. *J Affect Disord*. 2011 Dec;135(1-3):43–50.
21. Martinsson L, Wei Y, Xu D, Melas PA, Mathé AA, Schalling M, et al. Long-term lithium treatment in bipolar disorder is associated with longer leukocyte telomeres. *Transl Psychiatry*. 2013;3:e261.
22. Stertz L, Magalhães PVS, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 2013 Jan;26(1):19–26.
23. Boche D, Perry VH, Nicoll J a. R. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Feb;39(1):3–18.
24. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314–8.
25. Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis*. 2013 Jun;54:239–51.
26. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):287–92.
27. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23–35.
28. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec;5(12):953–64.
29. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):593–604.

30. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Nov 15;177(10):7303–11.
31. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):889–96.
32. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov;11(11):750–61.
33. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014;11:98.
34. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015 Aug;131:65–86.
35. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4319–30.
36. Nakagawa Y, Chiba K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther*. 2015 Oct;154:21–35.
37. Rao JS, Harry GJ, Rapoport SI, Kim HW. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. *Mol Psychiatry*. 2010 Apr;15(4):384–92.
38. Kohman RA, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun*. 2013 Jan;27(1):22–32.
39. Dean B. Understanding the role of inflammatory-related pathways in the pathophysiology and treatment of psychiatric disorders: evidence from human peripheral studies and CNS studies. *Int J Neuropsychopharmacol Off Sci J Coll Int Neuropsychopharmacol CINP*. 2011 Aug;14(7):997–1012.
40. Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol*. 2011 Sep;41(9):2498–502.
41. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010 Jul 29;67(2):181–98.
42. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Apr 1;184(7):3964–77.
43. Schroeter ML, Steiner J, Mueller K. Glial pathology is modified by age in mood disorders—a systematic meta-analysis of serum S100B in vivo studies. *J Affect Disord*. 2011 Nov;134(1-3):32–8.
44. Dong H, Zhang X, Dai X, Lu S, Gui B, Jin W, et al. Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced microglial activation via inhibition of toll-like receptor 4 expression by activating the PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *J Neuroinflammation*. 2014;11:140.

45. Kraft AD, Harry GJ. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jul;8(7):2980–3018.
46. Fries GR, Vasconcelos-Moreno MP, Gubert C, dos Santos BTMQ, Sartori J, Eisele B, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and illness progression in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol Off Sci J Coll Int Neuropsychopharmacol CINP*. 2015 Jan;18(1).
47. Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry J Ment Sci*. 1978 Nov;133:429–35.
48. Jones SH, Thornicroft G, Coffey M, Dunn G. A brief mental health outcome scale-reliability and validity of the Global Assessment of Functioning (GAF). *Br J Psychiatry J Ment Sci*. 1995 May;166(5):654–9.
49. Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, et al. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(4):675–92.
50. Barbosa IG, Bauer ME, Machado-Vieira R, Teixeira AL. Cytokines in bipolar disorder: paving the way for neuroprogression. *Neural Plast*. 2014;2014:360481.
51. McCartney-Francis N, Mizel D, Wong H, Wahl L, Wahl S. TGF-beta regulates production of growth factors and TGF-beta by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors Chur Switz*. 1990;4(1):27–35.
52. Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Aug 4;53:23–34.
53. Doganavsargil-Baysal O, Cinemre B, Aksoy UM, Akbas H, Metin O, Fettahoglu C, et al. Levels of TNF- α , soluble TNF receptors (sTNFR1, sTNFR2), and cognition in bipolar disorder. *Hum Psychopharmacol*. 2013 Mar;28(2):160–7.
54. Munkholm K, Braüner JV, Kessing LV, Vinberg M. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: a systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res*. 2013 Sep;47(9):1119–33.
55. Fiedorowicz JG, Prossin AR, Johnson CP, Christensen GE, Magnotta VA, Wemmie JA. Peripheral inflammation during abnormal mood states in bipolar I disorder. *J Affect Disord*. 2015 Nov 15;187:172–8.
56. Cao Y, Chen C, Weatherbee JA, Tsang M, Folkman J. gro-beta, a -C-X-C- chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. *J Exp Med*. 1995 Dec 1;182(6):2069–77.
57. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000 Jul;68(1):1–8.
58. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2007 May;97(5):755–62.

59. Rolstad S, Jakobsson J, Sellgren C, Isgren A, Ekman CJ, Bjerke M, et al. CSF neuroinflammatory biomarkers in bipolar disorder are associated with cognitive impairment. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 2015 Aug;25(8):1091–8.
60. Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem*. 1993 Dec 5;268(34):25803–10.
61. Harry GJ, Kraft AD. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology*. 2012 Mar;33(2):191–206.
62. Monfrim X, Gazal M, De Leon PB, Quevedo L, Souza LD, Jansen K, et al. Immune dysfunction in bipolar disorder and suicide risk: is there an association between peripheral corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 β ? *Bipolar Disord*. 2014 Nov;16(7):741–7.
63. Schiepers OJG, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Feb;29(2):201–17.
64. O'Brien SM, Scully P, Fitzgerald P, Scott LV, Dinan TG. Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy. *J Psychiatr Res*. 2007 Jun;41(3-4):326–31.
65. Song C, Halbreich U, Han C, Leonard BE, Luo H. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. *Pharmacopsychiatry*. 2009 Sep;42(5):182–8.
66. Haarman BCMB, Riemersma-Van der Lek RF, de Groot JC, Ruhé HGE, Klein HC, Zandstra TE, et al. Neuroinflammation in bipolar disorder - A [(11)C]-(R)-PK11195 positron emission tomography study. *Brain Behav Immun*. 2014 Aug;40:219–25.