

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA

**Dissertação de Mestrado**

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS E FATOR NEUOTRÓFICO  
DERIVADO DO CÉREBRO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM  
TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR**

Gledis Lisiane Motta

Orientador: Maurício Kunz

Porto Alegre, Junho 2014.

### CIP - Catalogação na Publicação

MOTTA, GLEDIS LISIANE  
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E FATOR NEUROTRÓFICO  
DERIVADO DO CÉREBRO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM  
TRANSTORNO DO HUMOR BIPOLAR / GLEDIS LISIANE MOTTA.  
-- 2014.  
77 f.

Orientadora: MAURICIO KUNZ.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria,  
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. MARCADORES INFLAMATÓRIOS. 2. CRIANÇAS E  
ADOLESCENTES. 3. TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR. I.  
KUNZ, MAURICIO, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Hospital de Clínicas, UFRGS e ao PPG de psiquiatria, pela formação em excelência;

As queridas Clarissa Paim e Cláudia Grabinski, mais do que secretárias, anjos da guarda;

Ao ProCAB... a todos os colegas que por ele passaram, a Dra Silzá Tramontina, pelo exemplo de dedicação a ser seguido e, principalmente, aos pacientes e suas famílias, pela batalha constante no enfrentamento de uma doença tão difícil;

Ao Dr. Maurício Kunz, que surgiu na hora certa, pela empatia nos momentos difíceis e competência intra e extra HCPA;

Aos amigos pela paciência da ausência e incentivo constante; ao meu primo/amigo Luis, parceiro de sonhos e das aulas de inglês...

A minha família, minha mãe pelo silêncio continente, meu pai pela ansiedade que faz andar para frente;

Ao Leonardo, meu marido, meu maior incentivador, que me dá a base firme para as conquistas profissionais e a parceria para as pessoais;

E por fim, a Natália... cuja gestação iniciou junto com o projeto do mestrado, que me ensinou o verdadeiro amor e me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia...

Às crianças e adolescentes, bipolares ou não...

Pelo constante aprendizado.

À Natália,

Por me ensinar o que faltava para ser uma psiquiatra infantil.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	05
Resumo.....	07
Abstract.....	09
1. Introdução.....	11
2. Fundamentação Teórica	
2.1. Algumas considerações sobre resposta imune.....	13
2.2. Citocinas e Transtorno de Humor Bipolar (THB).....	17
2.3. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) e Transtorno de Humor Bipolar.....	22
2.4. THB, biomarcadores e estabilizadores do humor.....	23
2.5. Transtorno do Humor Bipolar em Crianças e Adolescentes.....	24
2.6. Biomarcadores em Crianças e Adolescentes Bipolares.....	30
3. Referências Bibliográficas.....	32
4. Objetivos.....	45
5. Metodologia.....	46
6. Aspectos Éticos.....	50
7. Artigo.....	52
8. Considerações finais.....	75
9. Anexos.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain derived neurotrophic factor*

CPR – Proteína C Reativa

DSM-III-R – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder – III – Reviewed

IFN- $\gamma$  – Interferon Gama

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 Beta

IL1R $\alpha$  – Receptor antagonista de interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

PAMPs – Moléculas associadas a grupo de patógenos, do inglês “Pathogen-associated molecular pattern”

ProCAB - Programa de Crianças e Adolescentes Bipolares

sIL-2R – Receptor solúvel da interleucina 2

sIL-6R – Receptor solúvel da interleucina 6

sTNFR1 – Receptor solúvel do fator de necrose tumoral

TDAH – Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TOD – Transtorno de oposição e desafio

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa

THB - Transtorno Bipolar

THBia - Transtorno de Humor Bipolar em Crianças e Adolescentes

## RESUMO

Nas últimas décadas as pesquisas tem evidenciado o papel do sistema imune na fisiopatologia dos transtornos mentais. No Transtorno de Humor Bipolar (THB) os marcadores inflamatórios, destacando-se citocinas e neurotrofinas, tem recebido especial atenção. Citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e BDNF (*brain derived neurotrophic fator*) encontram-se alterados em episódios agudos de humor, principalmente na mania. O balanço destas biomarcadores parece estar diretamente relacionado com a neuroprogressão da doença. Entretanto os estudos até o momento são predominantemente em adultos e, na maioria, com doença crônica. A investigação de biomarcadores em crianças e adolescentes com Transtorno Bipolar pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia da doença.

Objetivo: investigar o comportamento dos biomarcadores (IL-6, IL-10 e BDNF) em crianças e adolescentes com Transtorno Bipolar.

Método: citocinas séricas e BDNF de 30 pacientes do Programa de Crianças e Adolescentes Bipolares (ProCAB) foram dosadas no momento do ingresso no programa e comparados com um grupo controle de crianças e adolescentes sem doenças psiquiátricas.

Resultados: Não houve diferença significativa entre pacientes bipolares e controles em relação a IL-6, IL-10 e BDNF. As variáveis clínicas e metabólicas também não foram correlacionadas aos biomarcadores estudados.

Conclusão: Diferentemente do que já está bem estabelecido na população adulta com THB, nosso estudo sugere que em crianças e adolescentes o THB não está



associado a disfunção do sistema imune e alterações de neurotrofinas. A ausência de literatura nesta população torna importante mais estudos que possam auxiliar para o melhor entendimento da fisiopatologia do THB na população pediátrica.

## **ABSTRACT**

Over the last decades, research has highlighted the role of the immune system in the pathophysiology of mental disorders. In Bipolar Disorders the inflammatory biomarkers, highlighting the cytokines and neurotrophins, have received special attention. Proinflammatory, anti inflammatory cytokines and BDNF are altered in acute episodes of humor, mainly in mania. The balance among them seems to be directly related to the neuroprogression of the disease. Nonetheless the researches up to this moment are predominantly in adults and, in majority, with chronic disease. The investigation of this biomarkers in children and adolescents with Bipolar Disorder may contribute to the understanding of the pathophysiology of the disorder.

Objective: to look through the biomarkers behavior (IL-6, IL-10 and BDNF) in children and adolescents diagnosed with Bipolar Disorder.

Method: Serum cytokines and BDNF of 30 patients from ProCAB (Programa de Crianças e Adolescentes Bipolares) were dosed when the patients initiated the program, and compared with a healthy control group.

Results: There were no meaningful differences between bipolar patients and controls in relation to IL-6, IL-10 and BDNF. The clinical and metabolic variables have also been correlated to the biomarkers.

Conclusion: Apart from what has already been established in the Bipolar Disorder adult population, our results suggest that in children and adolescents the disease is not associated to a dysfunction of the imune system and neurotrophins alterarion. The lack of literature in this population makes it important for more studies to better

understand the pathophysiology of Bipolar Disorder in pediatric population.

## 1. INTRODUÇÃO

---

Em várias áreas da medicina, os biomarcadores tem um papel importante que vai desde o diagnóstico, monitoramento da doença, prognóstico, até predição de resposta a tratamento (Goldstein et al., 2013). Nos últimos anos, diversas pesquisas voltaram-se para a busca de biomarcadores que possam, em conjunto com informações clínicas, contribuir para o diagnóstico e tratamento de transtornos psiquiátricos.

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é uma doença potencialmente grave e incapacitante. Incluído entre as 10 maiores causas de anos de vida perdidos por incapacidade, a prevalência estimada ao longo da vida gira em torno de 1,0% para TB tipo I, 1,1% para TB tipo II e 2,4% para TB subsindrômico (definido como hipomania recorrente sem episódio depressivo maior ou com menos sintomas do que o exigido para diagnóstico de hipomania) (Yatham et al 2009). Cerca de 20% dos indivíduos apresentam um curso crônico da doença (Taylor et al 2011), que também está associado a elevada mortalidade clínica e psiquiátrica (Perron et al 2009).

A maioria dos indivíduos manifestam a doença entre 15 e 25 anos, mas sabe-se que muitos já apresentavam sintomas prévios. O TB iniciado na infância e adolescência (THBia) é associado a casos graves, com alto risco de suicídio, psicose e uso de substâncias. Além disso, a doença prediz um dano devastador no

desenvolvimento com déficits no desempenho escolar, dificuldades familiares e dificuldades interpessoais (Birmaher et al., 2006; Biederman et al., 2004; Findling et al., 2001; Geller et al., 2002).

Apesar da multiplicação de estudos envolvendo biomarcadores na última década, na grande maioria a amostra é constituída de pacientes adultos, boa parte deles com doença crônica. Nestes, há fortes evidências ligando o THB a desregulação do sistema imune e neuroplasticidade (Kapczinski et al 2010).

O presente trabalho se propõe a avaliar, na população pediátrica com transtorno de humor bipolar, a dosagem sérica de interleucinas (IL-6 e IL-10) e BDNF, já associados ao THB em adultos, mas cujas evidências no THBia ainda são escassas.

### 2.1. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE RESPOSTA IMUNE

Doença é uma resposta normal à infecção, sendo caracterizada por mudanças endócrinas, autonômicas e comportamentais que são desencadeadas através de uma série de mecanismos, tanto no sítio da infecção, como a distância, a chamada resposta imune (Dantzer, 2008). Resposta imune é uma reação a componentes dos micróbios, assim como a macromoléculas (como proteínas e polissacarídeos) e pequenos produtos químicos que são reconhecidos como estranhos ao organismo, independente das consequências fisiológicas e patológicas de tal reação.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, sendo a resposta precoce à infecção. Seus mecanismos de ação são específicos a estruturas comuns aos agentes externos. A especificidade fica por conta da resposta adaptativa, ou adquirida. Esta é composta pela resposta humoral (linfócitos B) e resposta mediada por células (linfócitos T). Na resposta adaptativa, há produção de anticorpos pelos linfócitos B, com a formação da memória imunológica, permitindo a resposta vigorosa à exposição repetida e a secreção de mediadores inflamatórios pelos linfócitos T. A ativação da resposta imune inata ou adquirida se dá por uma série de mecanismos orquestrados principalmente por proteínas secretadas por vários tipos celulares que funcionam como reguladores e sinalizadores da resposta imunológica, as chamadas citocinas inflamatórias. Assim, por exemplo, a partir da

infecção por um agente estranho, quase imediatamente o sistema imunológico é ativado. As células fagocíticas da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos) migram para o sítio da infecção e prioritariamente fagocitam o invasor. A partir de então, antígenos carregados pelas células fagocíticas, substâncias liberadas pela célula fagocitada, entre outros componentes, acionam a resposta inflamatória. Inflamação é, então o processo de recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas do sangue, seu acúmulo nos tecidos e sua ativação para a destruição dos patógenos.

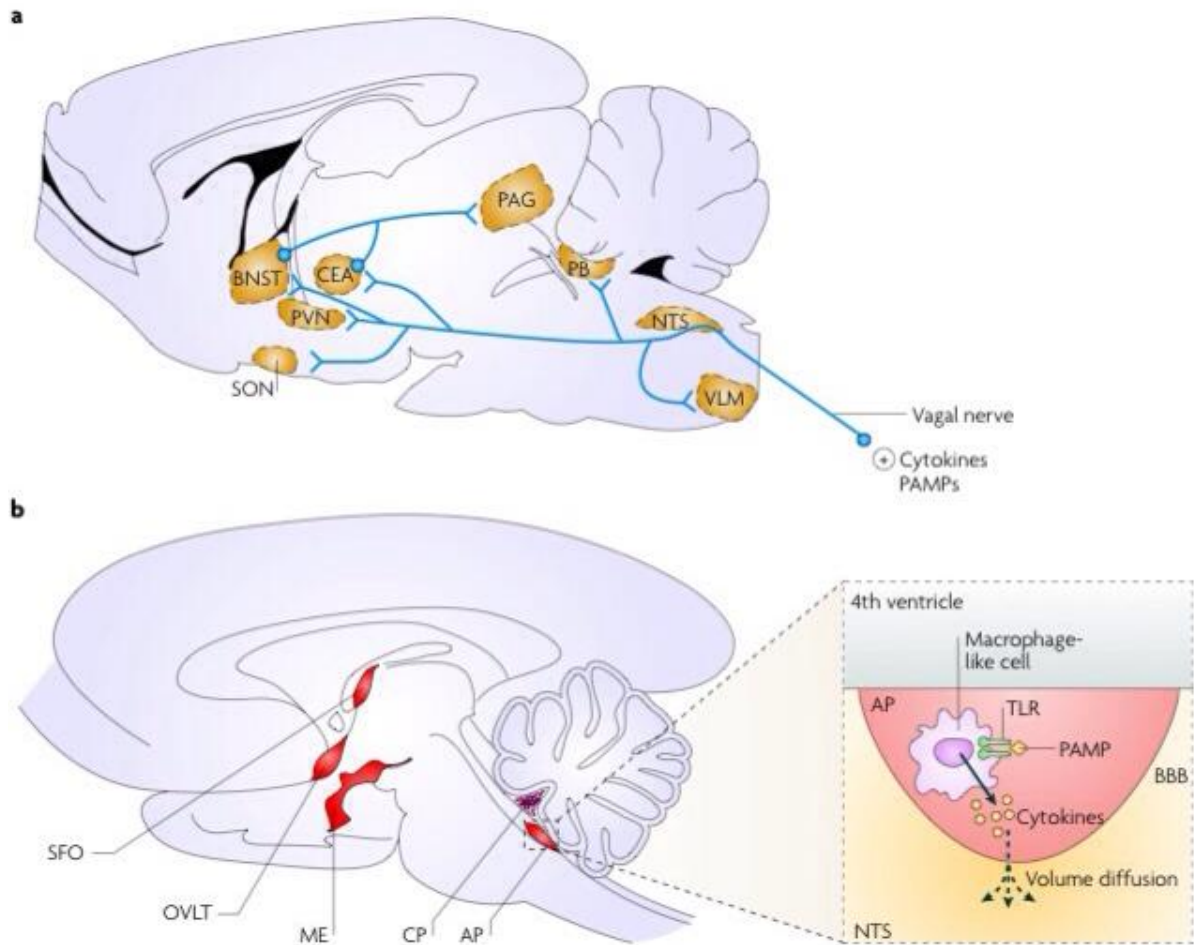
A resposta imune é regulada por um sistema de feedback positivo que amplifica a resposta e por mecanismos de controle que previnem reações inapropriadas ou patológicas (como a ativação excessiva de macrófagos). O balanço entre os sinais ativatórios e os inibitórios é característico de toda a resposta imune. As reações da resposta inflamatória são principalmente desencadeadas por citocinas e os efeitos locais ou sistêmicos destas vão ser responsáveis pela “reação de fase aguda”, com manifestações clínicas da infecção e doença inflamatória. Agem no hipotálamo como pirogênicos endógenos (estimulando a síntese de prostaglandinas). No sítio da infecção, estimulam o fluxo sanguíneo local e o aumento da permeabilidade dos vasos com conseqüente influxo do tráfico celular e níveis séricos de proteínas.

Em geral, em condições fisiológicas, citocinas são benéficas. Porém, em condições de ativação excessiva e/ou prolongada, essas substâncias podem levar a várias anormalidades, as quais podem estar ligadas a fisiopatologia dos transtornos mentais, dentre eles, o Transtorno de Humor Bipolar (THB). Estas incluem: diminuição do suporte neurotrófico, diminuição da neurogênese, aumento da

ativação glutamatérgica, estresse oxidativo, indução de apoptose, desregulação da inter-relação glia/neuronal. (Brietzke et al., 2011)

Diferente do que se acreditava até alguns anos atrás, hoje evidências sugerem que o cérebro monitora a resposta inflamatória atuando de várias formas: 1) ativação de nervos aferentes por citocinas produzidas localmente; 2) produção de citocinas pró-inflamatórias que entram no cérebro por difusão (via humoral); 3) transporte das citocinas pela barreira hemato-encefálica; 4) produção de prostaglandinas por receptores localizados nos macrófagos perivascularares e células endoteliais (Dantzer et al., 2008).





Vias de comunicação entre cérebro e sistema imune (adaptado de Dantzer et al, 2008): a) Via neural: ativação de vias aferentes primárias por PAMPs e citocinas, que se projetam para núcleos cerebrais; b) Via humoral: PAMPs circulantes que chegam no cérebro, induzindo a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, que entram no cérebro por um mecanismo ainda não bem conhecido, mas que envolve difusão.

Essas considerações atuais tem mudado a forma de pensar as doenças psiquiátricas, não mais como uma doença cerebral, mas como uma doença sistêmica, com um sistema “cérebro-citocina” diretamente envolvido na fisiopatologia das doenças.

## 2.2. CITOCINAS E TRANSTORNO DO HUMOR BIPOLAR

Um dos primeiros estudos ligando inflamação a doenças afetivas surgiu em modelos animais de depressão (Shimomura et al 1990). No ano seguinte, Smith propôs a teoria do envolvimento dos macrófagos na depressão. Através da administração de IL-1 em voluntários saudáveis e o consequente surgimento de sintomas suficientes para o diagnóstico de transtorno depressivo maior pelo DSM-III-R, o autor sugeriu que a base da doença se deva a produção de citocinas e substâncias inflamatórias através da ativação crônica do sistema de resposta imune, mediado por macrófagos e linfócitos T (Smith RS, 1991). A partir de então, vários estudos comprovaram que é possível mimetizar comportamentos depressivos em roedores através da administração de mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  ou IL-1 (Dantzer et al 2008).

Na última década, após as evidências crescentes do aumento da atividade pró-inflamatória na depressão e na esquizofrenia, multiplicaram-se estudos investigando o papel dos biomarcadores na fisiopatologia do TB. Atualmente os estudos apontam que a desregulação do metabolismo celular, falhas no mecanismos neuroprotetores e inflamação sejam fatores chaves no processo fisiopatológico da doença, indicando que marcadores periféricos dessas vias estão relacionados a atividade do THB (Kapczinski et al 2011).

Resultados robustos apontam que os episódios de humor podem ser agudamente nocivos e tóxicos para o organismo como um todo. Kapczinski et al 2010 propôs um “índice de toxicidade sistêmica”, composto por neutrofilas, marcadores de estresse oxidativo e marcadores inflamatórios que já haviam se

mostrado alterados em estudos prévios com pacientes bipolares. Com uma metodologia muito interessante, os autores estudaram marcadores periféricos em diferentes estados de humor e compararam a dois grupos controles, um saudável e outro composto por pacientes internados em UTI por sepse. O resultado revelou que o dano que os pacientes em episódios agudos de humor estão sujeitos é muito significativo, com tamanhos de efeito similares aos pacientes com sepse (Kapczinski et al 2010).

Em 2013, três meta-análises avaliaram o papel da citocinas no THB (Tabela 1). Em comum entre os resultados, foi o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , sIL-2R e sTNFR1. Os resultados devem ser interpretados com cautela, são usados diferentes métodos na mensuração das citocinas, há variação na seleção de pacientes, e outras diferenças que geram uma grande heterogeneidade entre os estudos (Munkholm K, Vinber M e Kessing L., 2013; Modabbernia A et al., 2013; Munkholm K et al.,2013b).

Apesar dos resultados das meta-análises não apontarem para a IL-6, diversos estudos associam a elevação desta citocina em episódios de humor (O'Brien et al., 2006; Ortiz-Dominguez et al., 2007; Goldstein et al., 2009; Kauer-Sant'Anna et al., 2009). A IL-6, juntamente com o TNF- $\alpha$  e a IL-1 são as principais citocinas pró-inflamatórias do sistema imune inato. Ela é sintetizada principalmente por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células em resposta a PAMPs, IL-1 e TNF $\alpha$ . É responsável pela síntese de outros mediadores inflamatórios no fígado e estimulação da produção de neutrófilos na medula óssea (Abbas & Lichtman, 2011). Pelo seu papel pró-coagulante, a IL-6 está fortemente

associada a doenças ateroscleróticas, obesidade e síndrome metabólica (Willerson & Ridker, 2004) podendo representar um elo entre o THB e as condições médicas gerais que acometem esses pacientes.

Mais de 80% dos pacientes bipolares apresentam outras condições médicas comórbidas (Kilbourne et al., 2004). As taxas de mortalidade por causas médicas nestes pacientes são de 1,5 a 3 vezes maiores que na população geral (Correl et al., 2008) e a expectativa de vida, comparados com pessoas sem doença mental, é de 10 a 11 anos a menos (Chang et al., 2011). Pacientes com THB possuem aumento da mortalidade por doença cardiovascular e cerebrovascular, maior prevalência de síndrome metabólica, risco aumentado para doenças auto-imunes (esclerose múltipla, tireotoxicose, colite ulcerativa, psoríase e artrite reumatóide) e 3 vezes mais chance de desenvolverem diabetes mellitus. Todas estas patologias tem em comum anormalidades no sistema imune e alterações nos marcadores inflamatórios, sugerindo que THB e comorbidades médicas podem compartilhar mecanismos fisiopatológicos como o desequilíbrio do sistema imune/inflamatório (Hamdani et al., 2013).

Estes mecanismos ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que esta associação não é consequência de um estilo de vida considerado como “não saudável” ou a muitos anos de exposição a medicação (Fiedorowicz et al., 2009). Alterações em determinadas citocinas são compartilhadas pelo THB e doenças cardiovasculares, por exemplo. Vários marcadores pró-inflamatórios que já demonstraram estar envolvidos na fisiopatologia do THB (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e PCR)

são também sabidamente citocinas pró-aterogênicas, associadas a formação e ruptura da placa arterosclerótica (Leboyer et al., 2012).

A IL-10 é uma inibidora dos macrófagos ativados e células dendríticas, estando envolvida no controle das reações imunes, agindo como feedback negativo, sendo por isso considerada uma interleucina anti-inflamatória.

As citocinas também parecem ter um papel importante no estadiamento do THB. Berk et al (2007) sugerem um modelo que vai dos sintomas prodrômicos ao estágio mais severo e refratário, consequência de episódios agudos repetidos. Da mesma forma, estudos mostraram que biomarcadores se comportam diferente em estágios precoces e tardios da doença. Kauer-Sant'Anna et al (2009) mostrou que no estágio inicial da doença, interleucinas (IL-6 e IL-10) e TNF- $\alpha$  estavam aumentados em relação aos controles saudáveis, com este aumento mantendo-se nos estágios mais severos da doença para IL-6 e TNF- $\alpha$ , mas não para IL-10. Quando comparados pacientes em estágio precoce e estágio avançado do THB, IL-6, IL-10 e BDNF mostraram-se diminuídos com a progressão da doença, enquanto TNF- $\alpha$  manteve-se aumentado. Outros estudos mostraram que em estágios crônicos de doença (tanto esquizofrenia quanto THB) a IL-10 encontra-se diminuída em relação aos controles (Kunz et al., 2011). O balanço da diminuição do BDNF (proteção) e IL-10 (antiinflamatória) e aumento persistente do TNF- $\alpha$  podem estar diretamente envolvido na neurodegeneração que o THB acarreta ao cérebro dos pacientes com longa história de doença. Mais estudos envolvendo estes marcadores em períodos iniciais de doença são fundamentais para o entendimento desta fisiopatologia.

**Tabela 1 – Meta-análises publicadas em 2013 sobre citocinas inflamatórias**

Meta-análises	Munkholm et al, Jan 13	Modabbernia et al Julh 13	Munkholm et al, Set 13
Número de estudos	13	30	18
Total de pacientes	556 THB 767 controles	1351 THB 1248 controles	761 THB 919 controles
IL 1 $\beta$	NS	↑ , porém NS	NS
IL 1RA	NS	↑↑ mania x controle ↑ eutimia x controle	NS
IL 2	NS	NS	NS
IL 4	NS	↑ x controles	↑ X controle
IL 6	NS	↑ x controles, porém NS ↑ Em mania x controles (0,44) ↑ Em mania x depressão (0,009)	NS
IL 8	NS	NS	NS
IL 10	NS	↑ x controles ↑ Depressão x controles (<0,08) ↑ Mania x controle (tendência)	NS
INF	NS	NS	NS
TNF $\alpha$	↑ mania x controle ↑ mania x eutimia	↑ x controle	↑ x controle
sIL-2R	↑ mania x controle	↑ x controle ↑ Mania x eutimia	↑ x controle
sIL-6R	NS	↑ x controles	↑ x controle
sTNFR1	↑ Mania x controle ↑ Mania x eutimia ↑ Eutimia x controle	↑ x controles ↑ Mania x controle ↑ Eutimia x controle	↑ x controle

NS: sem diferença estatisticamente significativa

↑ : aumentado

### 2.3. BDNF E TRANSTORNO DO HUMOR BIPOLAR

As neurotrofinas são moléculas fundamentais em vários aspectos do funcionamento do sistema nervoso central. O fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) é a neurotrofina mais atualmente estudada e ligada aos transtornos mentais. Esta molécula é ligada a neurogênese, plasticidade sináptica e crescimento dendrítico (Post, 2007), estando diretamente relacionada a sobrevivência celular e estabelecimento de circuitos neuronais (Lu et al., 2005). O BDNF pode cruzar a barreira hemato-encefálica, estando circulante no organismo (Karege et al., 2002) e com níveis séricos e plasmáticos correlacionados aos níveis no fluido cerebrospinal (Karege et al., 2005). Macrófagos, linfócitos, células do endotélio vascular e células do músculo liso são fontes de BDNF. Além desses sítios, neurônios e glia originários do sistema nervoso central são responsáveis por grande parte do BDNF circulante (Gielen et al., 2003).

No THB, vários estudos avaliaram os níveis circulantes do BDNF em estados de humor, com resultados controversos (Cunha et al., 2006; de Oliveira et al., 2009; Dias et al., 2009; Fernandes et al., 2009; Kauer-Sant'Anna et al., 2009; Lin 2009; Machado-Vieira et al., 2007; Monteleone et al., 2008; Palomino et al., 2006; Tramontina et al., 2009). Alguns estudos encontraram redução dos níveis circulantes de BDNF em estados alterados de humor – mania ou depressão (Cunha et al., 2006; de Oliveira et al., 2009; Fernandes et al., 2009; Lin 2009,), inclusive em pacientes sem uso de medicação (Machado-Vieira et al., 2007). Uma meta-análise dos estudos envolvendo níveis periféricos de BDNF e THB resultou em 13 estudos e 1113 pacientes (548 pacientes e 565 controles) (Fernandes et al., 2011). Seis

estudos avaliaram os níveis de BDNF em mania e cinco em depressão. Nos dois pólos da doença as análises mostraram que os níveis da neurotrofina estavam significativamente diminuídos em relação aos controles. O mesmo não aconteceu nos estudos que avaliaram pacientes eutímicos, neste grupo os níveis de BDNF não foram significativamente diferente em relação aos controles. Uma meta-regressão identificou que a média de idade e a média de anos de doença influenciaram significativamente a variação dos níveis do BDNF neste grupo, com pacientes mais idosos e com mais anos de doença correspondendo a níveis mais baixos da neurotrofina. O estudo também avaliou mudanças nos níveis séricos do BDNF em relação ao tratamento; os níveis aumentaram significativamente após o tratamento para mania, mas não na depressão (talvez pelo número limitado de estudos e amostra muito pequena).

Uma discussão interessante acerca do BDNF é de que ele possa ser um marcador de estado de humor, refletindo atividade da doença. Fernandes et al (2009) mostrou que é possível distinguir entre depressão bipolar e unipolar através da dosagem sérica do BDNF com uma acurácia de 95%, porém ainda são necessários mais estudos nesta linha.

#### **2.4. TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR, BIOMARCADORES E ESTABILIZADORES DE HUMOR**

Evidências sugerem que os estabilizadores de humor possuem uma ação predominantemente anti-inflamatória podendo influenciar nos níveis de citocinas e



BDNF. Estudos pré-clínicos sugerem efeitos imunomoduladores nos mecanismos de ação tanto do lítio (Kang et al 2012) como do ácido valpróico (Xuan et al 2012). Existem evidências que, pelo menos em parte, o efeito neuroprotetor destas medicações é facilitado pela indução do BDNF e ativação de seu receptor (Chiu et al 2013).

Dentre os estabilizadores de humor, o lítio é a medicação mais estudada. Ele parece atuar na restauração do balanço do sistema imune, aumentando os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) e diminuindo as pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) (Kniff et al 2007). Um estudo recente (Guloksuz et al 2012) investigou a associação de resposta ao lítio com níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes eufímicos e encontrou uma baixa resposta ao lítio nos pacientes com níveis mais altos de TNF- $\alpha$ . O autor sugere que o grupo de pacientes não-respondedores ao tratamento com lítio possam apresentar um estado pró-inflamatório prolongado e as medicações podem não ser efetivas em restaurar o balanço alterado do sistema imune e estabilizar o curso do THB.

## **2.5. TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

O Transtorno de Humor Bipolar em crianças e adolescentes sempre foi alvo de controvérsias. Quando, em 1921, Kraepelin descreveu no seu livro “Insanidade Maníaco-Depressiva” o que atualmente chamamos de Transtorno de Humor Bipolar, relatou que a maior frequência de ocorrência dos sintomas era entre 15 e 20 anos e que apenas 0,4% dos casos seriam em crianças menores que 10 anos. Em 1931,

Kasanin estudando adolescentes psicóticos descreveu o quadro clínico de mania, com elação, hiperatividade, irritabilidade e pressão de fala. Em contraste, o quadro de depressão incluía isolamento, discurso pobre, retardo nas funções de maneira geral e ocasionalmente recusa alimentar. Em 1935, Kanner descreveu tipos diferentes de apresentação da “doença maníaco-depressiva” em crianças, definindo períodos claros de mania e depressão e períodos livres de sintomas.

Por outro lado, os psicanalistas tentavam explorar e explicar a infância dos adultos com doença maníaco-depressiva. Melanie Klein defendia que dentro do desenvolvimento normal a criança precocemente transita entre estados maníacos e depressivos e que posteriormente mania e hipomania seriam mecanismos de defesas. Abraham defendia que estágios psicosexuais precoces do desenvolvimento poderiam influenciar no desenvolvimento posterior da doença.

Nos anos 50, o jornal “The Nervous Child” publicou vários artigos com a descrição da doença e crianças e adolescentes, aumentando ainda mais a discussão sobre o tema (Carlson GA, Glovinsky I, 2009). Em 1955, Campbell, em uma revisão da literatura sobre psicose maníaco-depressiva publicada no “Journal of the American Association” argumentava que a prevalência seria significativa na população psiquiátrica infantil se os casos passassem a ser diagnosticados adequadamente (Campbell, 1955).

Apesar dos poucos estudos epidemiológicos realizados nessas últimas décadas, dados recentes apontam que a prevalência do THB em crianças e adolescentes varia de 0.1% a 4%, dependendo dos critérios utilizados para o diagnóstico (Lewinsohn et al 1995; Axelson et al 2006). Em estudos retrospectivos,

50 a 60% dos pacientes adultos referem início dos sintomas antes dos 19-20 anos de vida e 13% antes dos 13 anos (Birmaher 2006, Chengappa, 2003, Pavuluri 2005).

Em 2001, Findling et al sugeriam que a prevalência de THB na população pediátrica pudesse estar subestimada pela dificuldade no diagnóstico, pois a apresentação clínica da doença em crianças e adolescentes parece diferir daquela conhecida em adultos (Findling et al 2001). Na última década, a literatura tem chamado atenção para um grande aumento no diagnóstico de transtorno de humor bipolar em crianças e adolescentes, internados ou ambulatoriais (Kloss AL and Robb AS, 2011; Raven M and Parry P, 2012; Goldstein BL and Birmaher B, 2012). Moreno et al relata que este aumento possa ter sido de 40 vezes num período de 10 anos (Moreno et al 2007). A grande discussão é se esse aumento deve a melhor identificação e consequente diagnóstico dos casos, ou se está havendo um superdiagnóstico da doença (Leibenluft 2011).

Uma das justificativas sugeridas para o aumento do diagnóstico de THB nesta população é a ausência de critérios diagnósticos específicos para esta faixa etária, uma vez que os manuais enfatizam sintomas na população adulta, não levando em conta as questões desenvolvimentais do período. Isto tem sido motivo de críticas e discussões. As principais controvérsias giram em torno do curso da doença (episódica X crônica) e da presença ou não de sintomas cardinais para o diagnóstico de mania. Enquanto alguns autores são mais conservadores, considerando que deve haver uma clara mudança nos níveis de funcionamento pré-mórbido e que o curso do THB em crianças e adolescentes assemelha-se aos adultos com episódios claros de mania/hipomania, depressão e eutímia (Leibenluft 2011), outros são mais

liberais. Strakowski et al defendem que a presença de sintomas de humor subsindrômicos em pacientes com risco pela história familiar já seriam suficientes para o diagnóstico (Strakowski et al 2011). Outros autores acreditam que a apresentação do THBia possa ter um curso crônico dos sintomas, com polarizações frequentes e rápidas e flutuações ocorrendo num mesmo dia (Goldstein 2012), ou com intensa irritabilidade e “outburst (crises de raiva) (Mick et al 2005). Talvez o ponto de vista mais liberal seja o que propõe a modificação na definição dos sintomas de mania, com 4h por dia de sintomas sendo suficiente para o diagnóstico (Geller et al 2002).

A irritabilidade é a alteração de humor mais frequente no THBia, sendo menos comum a ocorrência de humor eufórico. Esse humor irritável é associado a uma pobre capacidade de regulação das emoções e incapacidade de tolerar frustrações, o que acarreta muitas vezes em comportamentos agressivos. Outros aspectos importantes são a baixa recuperação inter-episódica, episódios mais longos (Birmaher 2007, Joshi & Wilens, 2009) e estados mistos, com sintomas maníacos e depressivos ocorrendo ao mesmo tempo, ou alternando-se de forma muito rápida, muitas vezes em questão de horas (Goodwin et al, 2000).

Despeito as discussões diagnósticas, o que se sabe é que o THB iniciado na infância ou adolescência está associado a um curso mais severo com altas taxas de suicídio, comportamentos de risco como promiscuidade e abuso de substâncias, dificuldades nas relações interpessoais, problemas legais, múltiplas hospitalizações e baixas taxas de recuperação (Carter et al 2003, Dickstein et al., 2004, Wilens et al 2004). THB em adolescentes também tem sido associado a taxas de psicose que

variam entre 15 e 76% (Axelson et al 2006; Findling et al 2001; Birmaher et al 2006; Tillman et al 2008). Em recente estudo, a prevalência de psicose em adolescentes bipolares foi 33%. Estes estiveram mais sintomáticos ao longo da vida, com maior número de episódios de humor, mais hospitalizações e maior prevalência de comorbidade com transtornos de ansiedade e história familiar positiva de psicose, além de menor pontuação na GAF, uma escala que avalia o funcionamento global (Hua et al 2011). Entre as alucinações, as auditivas foram as mais comuns, assim como no estudo conduzido por Pavuluri (Pavuluri et al 2004). Quanto aos delírios, os mais prevalentes foram os persecutórios, seguido dos grandiosos. No estudo de Pavuluri os delírios grandiosos foram mais frequentes. Outro estudo também associou a presença de psicose no THBia a mudanças rápidas de humor e mais relatos ideação e tentativa de suicídio (Birmaher et al 2006b).

Outro ponto importante a respeito do transtorno de humor na população pediátrica é o grande número de comorbidades. THB com início na infância e adolescência raramente ocorre sozinho, na ausência de patologias comórbidas, o que pode tornar diagnóstico e tratamento mais difíceis (Joshi & Wilens, 2009). As condições comórbidas mais frequentemente associadas ao THB com início na infância ou adolescência são o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), Transtorno de conduta, Transtorno de Oposição e Desafio (TOD), Depressão, Transtornos de Ansiedade (Pânico, Transtorno de Stress Pós-Traumático e Transtorno Obsessivo-compulsivo) e Transtornos por uso de substâncias.

O TDAH é a comorbidade mais estudada, principalmente pela sobreposição dos sintomas, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico. Biederman et al mostraram que a maioria das crianças com a comorbidade continua a apresentar critérios para ambas as patologias após a exclusão dos sintomas sobrepostos (Biederman et al 2004). Os estudos clínicos referem taxas de comorbidade entre TDAH e THBia entre 22 a 98% (Singh et al, 2006; Miller et al., 2013) sendo a presença de TDAH particularmente associada a início precoce do THB (Saches et al 2000). Também é frequente a comorbidade com Transtorno de Oposição e Desafio (TOD). Uma meta-análise em 2005 reportou prevalência de 54% de TOD entre crianças e adolescentes bipolares (Kowatch et al 2005). Essa grande frequência faz com que alguns autores questionem se o TOD pode ser uma consequência, um pródomo ou até mesmo uma manifestação precoce do THBia (Joshi & Wilens, 2009). Da mesma forma são relatadas altas taxas de comorbidade com Transtorno de Conduta, 69%, além um curso mais grave com maiores taxas de hospitalizações (Kovacs & Pollock 2005). Do ponto de vista diagnóstico, a grande questão é se os sintomas de conduta como roubo, mentiras e vandalismos podem estar relacionados a desinibição do episódio maníaco e o quanto se mantém os sintomas de conduta após o tratamento adequado do THB. (Joshi & Wilens 2009).

Transtorno Bipolar iniciado na adolescência parece aumentar o risco para o uso de substâncias na idade adulta (Perlis et al 2004). Em um estudo populacional, a prevalência de uso de substâncias ao longo da vida em adolescentes bipolares foi de 16%. Este mesmo estudo associou a comorbidade ao risco aumentado de tentativas de suicídio, transtorno de conduta, gestação e aborto (Goldstein et al

2008). Estudos mais antigos reportaram que em pacientes internados essa associação chega a 40% com grande prejuízo para o paciente (West et al 1996). Transtornos de ansiedade também tem sido associados ao THBia. Harpold et al encontraram, em uma amostra clínica, que 76% da população bipolar pediátrica apresentaram um ou mais transtorno de ansiedade. (Harpold et al 2005).

Existem poucos estudos avaliando a associação de comorbidades clínicas com THBia. Uma coorte que acompanhou 1841 pacientes pediátricos com THB encontrou risco significativo para obesidade, diabetes mellitus, dislipidemia, doenças cardiovasculares, hipertensão e asma (Jerrell et al 2010).

## **2.6. BIOMARCADORES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES BIPOLARES**

Até o momento da escrita deste trabalho, apenas dois estudos foram publicados avaliando biomarcadores na população pediátrica portadora de TB. Goldstein et al avaliaram a associação da IL-6, proteína C reativa (PCR) e níveis de BDNF em 30 adolescentes com diagnósticos de TB tipo I, tipo II e TB não especificado. O estudo encontrou associação entre a severidade dos sintomas maníacos e níveis de PCR ( $p=0,04$ ), porém o resultado perdeu a significância estatística quando controlado para obesidade, tornando-se uma tendência. IL-6 e BDNF não foram associados a mania, nem depressão. Além disso, indivíduos obesos apresentaram níveis mais altos de PCR e IL-6 que não obesos. Outro achado interessante é que 40% da amostra apresentou níveis aumentados de PCR, o que em adultos é considerado risco cardiovascular. O estudo apresenta várias

limitações: não há descrição do horário da coleta, não excluindo alterações do ritmo circadiano. Da mesma forma, os autores não citam possíveis vieses como uso de tabaco, (apenas indivíduos que relatavam uso de álcool e drogas ilícitas foram excluídos). Porém, a principal limitação do estudo é a ausência de um grupo-controle saudável (Goldstein et al., 2011).

Pandey et al (2008) conduziram um estudo que determinou a expressão gênica do BDNF em linfócitos e os níveis séricos em plaquetas em pacientes não-medicados e após 8 semanas de tratamento e comparou com controles normais. Os resultados mostraram decréscimo nos níveis de BDNF nos linfócitos de pacientes com THB e aumento dos níveis da neurotrofina com a instituição do tratamento.

Uma recente revisão envolvendo o papel das citocinas na depressão em adolescentes concluiu que pode haver diferenças significativas na neurobiologia da depressão entre adolescentes e adultos, apesar de algumas semelhanças (como aumento da IL-6). Os autores atentam para a importância de fatores que tem efeitos diretos na adolescência (neurodesenvolvimentais, mudanças hormonais, estresse e trauma) e que podem influenciar no comportamento das citocinas (Mills et al., 2013). Modelos animais também sugerem que os níveis de BDNF mudam ao longo do desenvolvimento, estando relacionados a idade, sexo (modulação hormonal) e, principalmente, estressores aos quais o indivíduo possa ter sido submetido desde a vida pré-natal (Bath et al., 2013).



### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology functions and disorders of the immune system. 3rd ed. Philadelphia, Soundres, 2011.

Axelson D, Birmaher B, Strober M, Gill MK, Valeri S, Chiappetta L, et al. Phenomenology of children and adolescents with bipolar spectrum disorders. Arch Gen Psychiatry. 2006, Oct;63(10):1139-48.

Bardach NS, Coker TR, Zima BT, Murphy JM, Knapp P, Richardson LP, et al. Common and costly hospitalizations for Pediatric Mental Health Disorders. Pediatrics. 2014 Apr;133(4)602-609.

Bath KG, Schilit A, Lee FS. Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex and form of stress. Neuroscience. 2013 Jun 3;239:149–156.

Berk M, Hallam K, McGorry P. The potential utility of a staging model as a course pacifier: a bipolar disorder perspective. J Affect Disord. 2007;100(1-3): 279-281.

Biederman J, Mick E, Faraone SV, Van Patten S, Burbach M, Wozniak J. A prospective follow-up study of pediatric bipolar disorder in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. J Affect Disord. 2004 Oct;82 Suppl 1:17-23.

Biomarker Definition Working Group. Biomarker and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001 Mar;69(3):89-95.

Birmaher B, Axelson D. Course and outcome of bipolar spectrum disorder in children and adolescents: A review of the existing literature. *Dev Psychopathol.* 2006;18(4):1023-35.

Birmaher B, Axelson D, Strober M, Gill MK, Valeri S, Chiappetta L, et al. Clinical course of children and adolescents with bipolar spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2006 Feb;63(2):175 –183.

Birmaher B. Longitudinal course of pediatric bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 2007 Apr;164(4):537-9.

Brietzke E, Stabellini R, Grassis-Oliveira R, Lafer B. Cytokines in bipolar disorder: recent findings, deleterious effects but promise for future therapeutics. *CNS Spectr.* 2011 Jul 1;16(7):157-168.

Campbell J. Manic-depressive disease in children. *Jama.* 1955;158:154-7.

Carter TD, Mundo E, Parikh SV, Kennedy JL. Early age at onset as a risk factor for poor outcome of bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2003 Jul-Ago;37(4):297-303.

Carlson G, Glover I. The concept of bipolar disorder in children: a history of the bipolar controversy. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2009 Apr;18(2): 257-71.

Chengappa KN, Kupfer DJ, Frank E, Houck PR, Grochocinski VJ, Cluss PA, Stapf DA. Relationship of birth cohort and early age at onset of illness in a bipolar disorder case registry. *Am J Psychiatry.* 2003 Sep;160(9):1636-1642.

Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG, Chuang DM. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: Beyond Bipolar Disorder. *Pharmacol Rev.* 2013 Jan 8;65(1):105–142.

Correll CU, Frederickson AM, Kane JM, Manu P. Equally increased risk for metabolic syndrome in patients with bipolar disorder and schizophrenia treated with second-generation antipsychotics. *Bipolar Disord.* 2008 Nov;10(7):788-97.

Cunha AB, 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.* May 8;398(3):215-219.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammations to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jan;9(1):46-56.

de Oliveira GS, Ceresér KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2009 Sep;43(14):1171-1174.

Dias VV, Brissos S, Frey BN, Andreazza AC, Kapczinski F. Cognitive function and serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2009 Sep;11(6):663-671.

Dicksteins DP, Treland JE, Snow J, McClure EB, Mehta MS, Towbin KE, et al. Neuropsychological performance in pediatric bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2004 Jan 1;55(1):32-9.

Fernandes BS, Gama CS, Kauer-Sant'Anna M, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar and unipolar depression: a potential adjunctive tool for differential diagnosis. *J Psychiatr Res.* 2009 Oct;43(15):1200-1204.

Fernandes BS, Gama CS, Ceresér KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res.* 2011 Aug;(8):995-1004.

Fiedorowicz JG, Solomon DA, Endicott J, Leon AC, Li C, Rice JP, et al. Manic/hypomanic symptom burden and cardiovascular mortality in bipolar disorder. *Psychosom Med.* 2009 Jul;71(6):598-606.

Findling RL, Gracious BL, McNamara NK, Youngstrom EA, Demeter CA, Branicky LA, Calabrese JR. Rapid, continuous cycling and psychiatric comorbidity in pediatric bipolar I disorder. *Bipolar Disord.* 2001 Aug;3(4):202–210.

Geller B, Zimmerman B, Williams M, Delbello MP, Frazier J, Beringer L. Phenomenology of prepuberal and early adolescent bipolar disorder: Examples of elated mood, grandiose behaviors, decreased need for sleep, racing thoughts and hypersexuality. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2002;12:3–9.

Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F. Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol.* 2003 May;57(5):493-497.

Goldstein B, Young LT. Toward clinically applicable biomarkers in bipolar disorder: focus on BDNF, inflammatory markers and endothelial function. *Curr Psychiatry Rep* 2013 Dec;15(12):425.

Goldstein B. Recent progress in understanding pediatric bipolar disorder. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012 Apr;166(4):362-71.

Goldstein B, Birmaher B. Prevalence, clinical presentation and differential diagnosis of pediatric bipolar disorder. *Isr J Psychiatry and Relat Sci*. 2012;49(1):3-14.

Goldstein B, Collinger KA, Lotrich F, Marsland AL, Gill MK, Axelson DA, Birmaher B. Preliminary findings regarding proinflammatory markers and Brain-Derived Neurotrophic Factor among adolescents with bipolar spectrum disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2011 Oct;21(5):479-84.

Goldstein B, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity and treatment of bipolar disorder: A Systematic Review of the Literature. *J Clin Psychiatry*. 2009 Aug;70(8):1078-90.

Goldstein B, Strober MA, Birmaher B, Axelson DA, Esposito-Smythers C, Goldstein TR. Substance use disorders among adolescents with bipolar spectrum disorders. *Bipolar Disord*. 2008 Jun;10(4):469–478.

Goodwin G. Perspectives for clinical research on bipolar disorders in the new millennium. *Bipolar Disord*. 2000 Dec;2(4):302-4

Guloksuz S, Altinbas K, Aktas CE, Kenis G, Bilgic Gazioglu S, Deniz G, et al. Evidence for an association between tumor necrosis factor-alpha levels and lithium response. *J Affect Disord.* 2012 Dec 20;143(1-3):148-52.

Hamdani N, Doukhan R, Kurtlucan O, Tamouza R, Leboyer M. Immunity, inflammation and bipolar disorder: diagnostic and therapeutic implications. *Curr Psychiatric Rep.* 2013 Set;15(9):387.

Harpold TL, Wozniak J, Kwon A, Gilbert J, Wood J, Smith L, Biederman J. Examining the association between pediatric bipolar disorder and anxiety disorders in psychiatrically referred children and adolescents. *J Affect Disord.* 2005 Sep;88(1):19-26.

Hua LL, Wilens TE, Martelon M, Wong P, Wozniak J, Biederman J. Psychological functioning, familiarity, and psychiatric comorbidity in bipolar youth with and without psychotic features. *J Clin Psychiatry.* 2011 Mar;72(3):397-405.

Kang K, Kim YJ, Kim YH, Roh JN, Nam JM, Kim PY, et al. Lithium pretreatment reduces brain injury after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurol Res.* 2012 Jun;34(5):447-54.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Mol Psychiatry.* 2010 Aug;15(8):784-786.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AI, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011 Feb;45(2):156-61.

Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*. 2005 May 1;57(9):1068-1072.

Kauer-Sant'Anna, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patient with early vs late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 May;12(4):447-458.

Kilbourne AM, Cornelius JR, Han X, Pincus HA, Shad M, Salloum I, et al. Burden of general medical conditions among individual with bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2004 Oct;6(5):368-373.

Knijff EM, Breunis MN, Kupka RW, de Wit HJ, Ruw Hof C, Akkerhuis GW, et al. An imbalance on the production of IL-1B and IL-6 by monocytes of bipolar patients restoration by lithium treatment. *Bipolar Disord*. 2007 Nov;9(7)743-753.

KRAEPELIN, Emil. *Manic-depressive insanity and paranoia*. (Barclay M, trans). Edinburgh (UK): Livingstone;1921.

Kloos AL, Robb AS. Bipolar disorder in children and adolescents. *Pediatr Ann*. 2011 Oct;40(10):481-7.

Kowatch RA, Fristad M, Birmaher B, Wagner KD, Findling RL, Hellander M, et al. Treatment guidelines for children and adolescents with bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2005;44(3):213-35.

Kovacs M, Pollock M. Bipolar disorder and comorbid conduct disorder in childhood and adolescence. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1995;34:715-23.

Kunz M, Ceresér KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF-  $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 33, n.3, p.268-274, 2011.

Jerrel JM, McIntyre RS, Tripathi A. A Cohort study of prevalence and impact of comorbid medical conditions in pediatric bipolar disorder. *J of Clin Psychiatry*. 2010 Nov;71(11):1518-1525.

Joshi G, Wilens T. Comorbidity in pediatric bipolar disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2009 Apr;18(2):291-319.

Leboyer M, Soreca I, Scott J, Frye M, Henrey C, Tamouza R, Kupfer DJ. Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease? *J Affec Disord*. 2012 Dec;141(1):1-10.

Lewinsohn PM, Klein DN, Seeley JR. Bipolar disorders in a community sample of older adolescents: prevalence, phenomenology, comorbidity, and course. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1995 Apr;34(4):454–463.

Leibenluft E. Severe Mood Dysregulation, irritability, and the diagnostic boundaries of bipolar disorder in youths. *Am J Psychiatry*. 2011;168(2):129-42.



Lin PY. State-dependent decrease in levels of brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: a meta-analytic study. *Neurosci Lett* 2009 Dec;466(3):139–43,

Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosc.* 2005 Aug;6(8):603-614.

Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, et al. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry.* 2007 Jan;61(2):142-144.

Mick E, Spencer T, Wozniak J, Biederman J Heterogeneity of irritability in attention-deficit/hyperactivity disorder subjects with and without mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2005 Oct;58(7):576–582.

Mills NT, Scott JG, Wray NR, Cohen-Woods S, Baune BT. Research Review: The role of cytokines in depression in adolescents: a systematic review. *J Child Psychol Psychiatry.* 2013 Aug;54(8):816-835.

Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: A meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry.* 2013 Jul;74(1):15-25.

Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, Maj M. Decreased levels of serum brain derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. *Bipolar Disord.* 2008 Feb;10(1):95-100, 2008.

Moreno C, Laje G, Blanco C, Jiang H, Schmidt AB, Olfson M. National trends in the outpatient diagnosis and treatment of bipolar disorder in youth. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Sep;64(9):1032-9.

Mukholm K, Viberg M, Vendel Kessing L. Cytokines in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2013 Jan;144(1-2):16-27.

Munkholm K, Brauner 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):1119-1133.

Miller S, Chang KD, Ketter TA. Bipolar disorder and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder comorbidity in children and adolescents: evidence-based approach to diagnosis and treatment. *J Clin Psychiatry*. 2013 Jun;74(6):628-9.

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):263-267.

Ortiz-Domínguez A, Hernández ME, Berlanga C, Gutiérrez-Mora D, Moreno J, Heinze G, Pavón L. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord*. Sep;9(6):596-602.

Pandey GN, Rizavi HS, Dwivedi Y, Pavuluri MN. Brain-Derived Neurotrophic Factor gene expression in pediatric bipolar disorder: effect of treatment and clinical response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. Sep;47(9):1077-1085.

Palomino A, Vallejo-Illarramendi A, González-Pinto A, Aldama A, González-Gómez C, Mosquera F, et al. Decreased levels of plasma BDNF in first-episode

schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophrenia Research*. 2006 Sep;86(1-3):321-322.

Pavuluri MN, Birmaher B, Naylor MW. Pediatric bipolar disorder: ten year review. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2005 Set;44(9):846–871.

Pavuluri MN, Herbener ES, Sweeney JA. Psychotic symptoms in pediatric bipolar disorder. *Journal of Affect Disord*. May;80(1):19–28.

Perlis RH, Miyahara S, Marangell LB, Wisniewski SR, Ostacher M, DelBello MP, et al. Long-term implications of early onset in bipolar disorder: data from the first 1000 participants in the Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder (STEP-BD). *Biol Psychiatry*. May;55(9):875-81.

Perron BE, Howard MO, Nienhuis JK, Bauer MS, Woodward AT, Kilbourne AM. Prevalence and Burden of General Medical Conditions Among Adults With Bipolar I Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions [CME]. *J Clin Psychiatry*. 2009 Oct;70(10):1407-1415.

Post, RM. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31(6):858-873.

Raven M, Parry P. Psychotropic Marketing Practices and Problems Implications for DSM-5. *J Ner Ment Dis*. 2012 Jun;200(6): 512-6.

Sachs GS, Baldssano CF, Truman CJ, Guille C. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with early- an late-onset 2000bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2000 Mar;157(3):466-8.

Shimomura Y, Shimizu H, Takahashi M, Uehara Y, Negishi M, Sato N, et al. Effects of peripheral administration of recombinant human interleukin-1 beta on feeding behavior of the rat. *Life Sci.* 1990;47:(24):2185-2192.

Sing MK, DelBello MP, Kowatch RA, Strakowski SM. Co-occurrence of bipolar and attention-deficit hyperactivity disorders in children. *Bipolar Disord.* 2006 Dec;8(6):710-720.

Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses.* 1991 Oct;36(2):178.

Strakowski S, Fleck D, Maj M. Broadening the diagnosis of bipolar disorder: Benefits vs. risks. *World Psychiatry.* 2011 Oct;10(3):181–186.

Taylor M, Bressan RA, Pan Neto P, Brietzke E. Early intervention for bipolar disorder: current imperatives, future directions. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011 Oct;33 suppl.2:s197-212.

Tramontina JF, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, Kapczinski F. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neurosci Lett.* 2009 Mar 13;452(20):111-113.

Tillman R, Geller B, Klages T, Corrigan M, Bolhofner K, Zimmerman B. Psychotic phenomena in 257 young children and adolescents with bipolar I disorder: delusions and hallucinations (benign and pathological). *Bipolar Disord.* 2008 Feb;10(1):45–55.

Yatham LN, Kennedy SH, Schaffer A, Parikh SV, Beaulieu S, O'Donovan C, 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 2009. *Bipolar Disord*. 2009 May;11(3):225-55.

Wilens TE, Biederman J, Kwon A, Ditterline J, Forkner P, Moore H, et al. Risk of substance use disorders in adolescents with bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004 Nov;43(11):1380-1386.

West SA, Strakowski SM, Sax KW, McElroy SL, Keck Jr, McConville BJ, Scott. et al. Phenomenology and comorbidity of adolescents hospitalized for the treatment of acute mania. *Biol Psychiatry*. 1996 Mar 15;39(6):458-60.

Willerson J, Ridker P. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II2-10.

Xuan A, Long D, Li J, Ji W, Hong L, Zhang M, Zhang W. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischaemia in rats. *Life Sci*. 2012 Mar 10;90(11-12):463-8.

## 4. OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GERAL:

Investigar as alterações de marcadores inflamatórios e BDNF em crianças e adolescentes com Transtorno de Humor Bipolar e suas relações com variáveis clínicas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Comparar níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) e do BDNF em crianças e adolescentes com diagnóstico de Transtorno de Humor Bipolar, em relação a um grupo controle sem diagnóstico psiquiátrico.

- Avaliar a correlação desses biomarcadores com variáveis clínicas: índice de massa corporal, glicemia de jejum e perfil lipídico.

### DELINEAMENTO

Estudo transversal.

### POPULAÇÃO

Este estudo pertence a um projeto maior, uma coorte que pretende acompanhar pacientes com Transtorno Bipolar desde o início dos sintomas (na infância e adolescência) até a idade adulta. Assim, nossa amostra foi selecionada no Programa de Crianças e Adolescentes Bipolares (ProCAB), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os controles foram incluídos na ausência de qualquer transtorno mental, avaliado pelos critérios do DSM IV, ou história de transtornos de humor em familiares de primeiro grau.

Critérios de inclusão:

- preencher critérios para TB de acordo com os critérios do DSM IV
- idade entre 5 a 17 anos
- assinatura do consentimento informado pelos responsáveis e consentimento verbal pelos pacientes

Critérios de exclusão:

- presença de diagnóstico de Transtorno Pervasivo do Desenvolvimento;
- diagnóstico de Esquizofrenia, dependência ou abuso de substâncias;
- riscos de suicídio e/ou homicídio que impeça tratamento ambulatorial;
- diagnóstico clínico de doença inflamatória sistêmica ou uso de medicações anti-inflamatórias.

## AValiação CLÍNICA

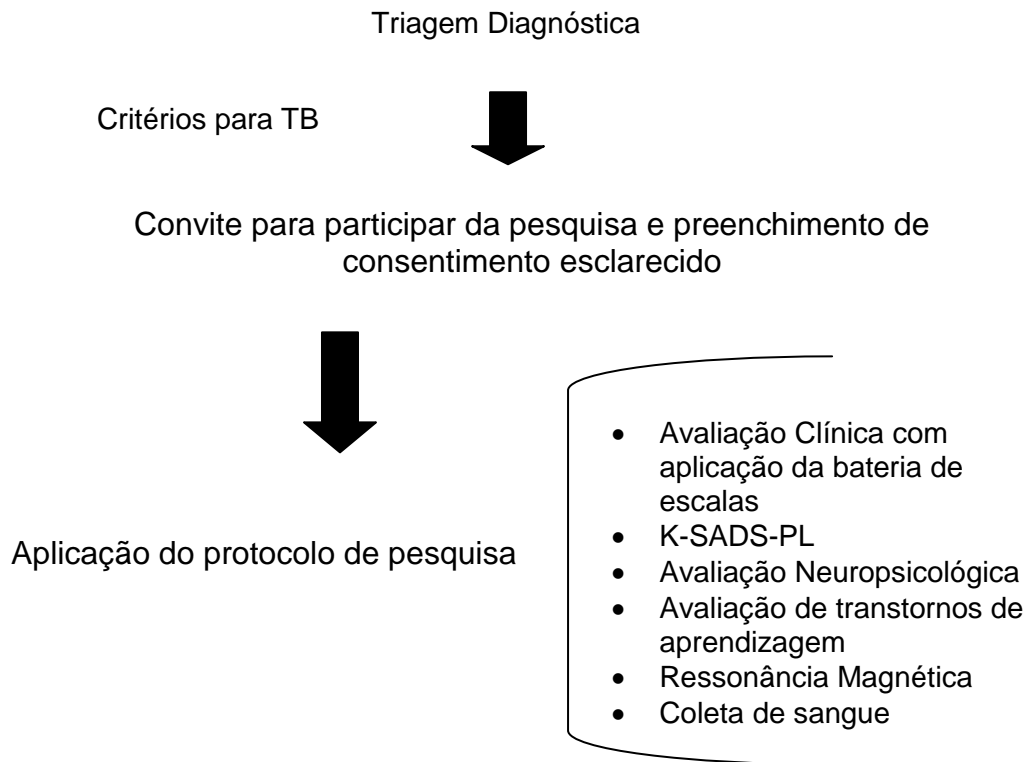
Pacientes encaminhados ao Programa de Crianças e Adolescentes Bipolares (PROCAB) passam pela seguinte avaliação:

- Triagem diagnóstica – sintomas de humor conforme DSM-IV e história familiar. Se o paciente preenche critérios, o paciente é encaminhado para a avaliação completa.
- Aplicação de entrevista estruturada (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-age Children, PL-W) por entrevistador treinado. Esta entrevista estruturada deriva diagnósticos psiquiátricos conforme o DSM, já estando traduzida para o português e em uso clínico em centros de referência nacionais de Psiquiatria da Infância e Adolescência;
- Testagem neuropsicológica;
- Investigação de transtornos do aprendizado com psicopedagoga;
- Avaliação clínica com preenchimento de escalas de sintomas, coleta de amostra sanguínea e ressonância magnética acontecem no mesmo dia.

Após todas as avaliações, o grupo de pesquisa discute o diagnóstico e propõe o tratamento multimodal com abordagem psicofarmacológica e psicossocial, baseado nas evidências científicas disponíveis.



## FLUOXOGRAMA DO ESTUDO



## COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletados oito mililitros de sangue por punção venosa de cada sujeito no mesmo dia da entrevista clínica e colocado em um tubo a vácuo sem anticoagulante. O sangue foi imediatamente centrifugado a 300xg por 5 minutos e o soro congelado a menos 80°C até ser analisado. Os níveis séricos das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10) foram dosados utilizando kits comerciais, segundo instruções do fabricante.

## 6. ASPECTOS ÉTICOS

---

Este estudo envolve somente riscos associados ao questionamento, obtenção de informações e punção intravenosa para coleta de sangue. O grupo de pesquisa pode garantir confidencialidade das informações e oferecer apoio se necessário.

Todos os pacientes ou seus responsáveis legais deverão assinar o termo de consentimento informado conforme aprovado pelo comitê de ética, estando livres para decidir em qualquer momento sobre sua descontinuidade, independente do seu atendimento no HCPA.

O estudo abrange os princípios bioéticos de autonomia, beneficência, não maleficência, veracidade e confidencialidade. O estudo já foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA, sob número 07-641.

---

**Submetido ao *Journal of Affective Disorders* - JAD-D-14-00438**

Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in pediatric bipolar disorder.

Gledis Lisiane Motta<sup>1</sup>, Silzá Tramontina<sup>1</sup>, Cristian P. Zeni<sup>1,2</sup>, Bianca Wollenhaupt-Aguiar<sup>3,4</sup>, André Contri Paz<sup>4</sup>, Luis A. Rohde<sup>1,2</sup>, Flávio P. Kapczinski<sup>3</sup>, Maurício Kunz<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Program for Children and Adolescents with Bipolar Disorder (ProCAB), Child and Adolescent Psychiatry Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>ADHD Outpatient Program (PRODAH), Child and Adolescent Psychiatry Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

<sup>3</sup>Bipolar Disorders Program, Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Author:

Gledis Lisiane Motta

Hospital de Clínicas de Porto Alegre/CPE, Molecular Psychiatry Laboratory

Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio Anexo. CEP 90035-903 – Porto Alegre, Brazil.

Phone: +55 51 33598845; fax +55 51 33598846

## Abstract

**BACKGROUND:** There is significant evidence supporting the association of altered levels of cytokines and neurotrophins in adults with bipolar disorder (BD). However, this relationship remains uncertain in pediatric bipolar disorder.

**METHODS:** We measured serum interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in a sample of 30 children and adolescents with diagnosis of BD, and compared them to a sample of 32 healthy controls. Patients and controls were investigated regarding medical comorbidities, body mass index and lipid profile.

**RESULTS:** There was no significant difference in levels of IL-6, IL-10 and BDNF between patients with BD and controls. There were also no significant correlations between IL-6, IL-10 and BDNF with clinical and metabolic variables.

**CONCLUSION:** Our results suggest that BD in pediatric patients is not associated with immune system dysfunction and alterations of neurotrophins, contrary to what is found in adult patients. This was the first study to assess serum levels of cytokines and the second involving BDNF in children and adolescents with bipolar disorder compared with healthy controls. As the literature is still scarce as to pediatric BD, this study aids to better understanding the pathophysiology of this disorder.

Key words: Pediatric bipolar disorder; Biomarkers; Cytokines; IL-6; IL-10; Brain-derived neurotrophic factor.

## 1. Introduction

The past decade has seen remarkable growth in our understanding of the relationship between the immune system, neuroplasticity and psychiatric disorders, including Bipolar Disorder (BD) (Kapczinski et al., 2010). In adults, accumulating evidence suggests that BD is associated with immune system dysregulation. Patients with BD exhibit increased peripheral levels of proinflammatory markers, mainly during acute mood episodes and especially during mania (O'Brien et al., 2006; Brietzke et al., 2009; Goldstein et al., 2009). Three meta-analyses have recently reviewed the evidence of cytokines alterations in BD, emphasizing that immune abnormalities play a significant role in the pathophysiology of BD (Modabbernia et al., 2013; Munkholm et al., 2013a; Munkholm et al 2013b). In this context, interleukin-6 (IL-6), that is a pro-inflammatory cytokine, and interleukin-10 (IL-10), that has mainly an anti-inflammatory effect, have both been frequently associated with BD. Also, disturbances in neurotrophins, particularly the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), have also been associated with BD (Rosa et al., 2006; Walz et al., 2009). A meta-analysis that included thirteen studies concluded that BDNF levels were decreased in both mania and depression when compared to controls, but not during euthymia. A meta-regression analyses showed that age and length of illness influenced the variation in BDNF (Fernandes et al., 2011).

Despite a growing body of evidence about the role of cytokines and BDNF in BD, the sample in most studies consists only of adults, much of them with chronic disease. Bipolar disorder in children and adolescents presents several clinical particularities, including predominantly mixed symptoms, longer episodes, poor recovery between

episodes and high relapse rates, with marked irritability and chronicity (Birmaher 2007, Joshi & Wilens, 2009). Taken together, these particular features may suggest that the pathophysiology of BD is different in adults and children. As far as we know, there are only two studies that examined inflammatory markers and neurotrophins in children and adolescents with bipolar disorder. Goldstein et al (2011) examined high-sensitivity C-reactive (hsCRP), IL-6 and BDNF in 30 patients. The study suggests a positive association between hypomanic/maniac symptom severity and hsCRP and negative association between BDNF and IL-6 levels. Pandey et al (2008) conducted a study that determined the gene expression of BDNF in lymphocytes and protein levels of BDNF in platelets of drug-free patients with pediatric BD before and after eight weeks of treatment. The results showed decreased levels of BDNF in lymphocytes of patients compared with healthy controls and increased levels associated with treatment.

As the literature is still scarce in this matter, the purpose of our study is to evaluate serum levels of IL-6, IL-10 and BDNF in a sample of pediatric bipolar disorder patients compared with healthy controls.

## 2. Methods

### Sample:

We recruited patients from our Child and Adolescent Bipolar Disorder Outpatient Program (ProCAB) from the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil.



All patients met criteria for BD according DSM-IV and had between 5 to 17 years old. Exclusion criteria were: diagnoses of pervasive developmental disorder, schizophrenia and substance dependence and severe suicide/homicide risk. Control subjects were selected from a school in Porto Alegre and were included if they did not present any current or past DSM-IV diagnosis or history of mood disorders in first-degree relatives. Parental written informed consent and children verbal assent were obtained. This study was approved by the ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, project number 07.641, and it is in accordance with the Helsinki Declaration of 2013 (World Medical Association, 2013).

#### Diagnostic assessment

Diagnostic assessment was conducted through a three-stage process. First, the caregivers were interviewed assessing the presence of DSM-IV mood symptoms and family history of psychiatric disorders. If subjects fulfill DSM-IV criteria for Bipolar I, Bipolar II, or Bipolar Not Otherwise Specified, they went through neuropsychological and learning disorders assessments. In addition, subjects were assessed with the K-SADS-PL (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for Scholl-Age Children-Present and Lifetime Version) by trained interviewer (Kaufmann et al., 1997). Finally, a child and adolescent psychiatrist performed a clinical evaluation of BD and comorbid conditions using DSM-IV criteria with parents and patients, also checking the positive diagnoses derived from K-SADS-PL. After the clinical assessment, a discussion with the whole research group was conducted for final diagnoses and treatment planning. The diagnostic approach in the sample from the community followed the same diagnostic flow.

## Symptom Measures

Depressive symptoms were assessed with the Brazilian version of the Children Depression Rating Scale – Reviewed (CDRS-R) (Poznanski et al., 1984; Barbosa et al., 1997). Manic symptoms were rated using the Young Mania Rating Scale (YMRS) (Young et al., 1978). This scale was translated and validated to Portuguese (Vilella et al., 2005). It is a 11-item scale for the assessment of severity of mania symptoms that has similar efficiency across the age groups, including youth age 4-17.

## Clinical Assessments

Patients were investigated regarding the presence of medical comorbidities, and had body mass index and laboratory tests assessments (blood glycaemia, lipid profile, renal function, liver function, thyroid function).

## Cytokine assay

The concentration of serum cytokines was determined by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets for humans IL-10 and IL-6 (BD Biosciences, San Diego, CA). Sample processing and data analysis were performed according to the manufacturer's instructions. Data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA) and results were generated using the BD CBA Analysis Software FCAP Array™ (BD Biosciences, San Diego, CA).

## BDNF measurement

Four milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture into a free-anticoagulant vacuum tube. The blood was centrifuged at 4000g for 10 min and serum was kept frozen at -80°C until assayed. BDNF serum levels were determined by sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for BDNF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated overnight at room temperature with the monoclonal anti-BDNF antibody at 4 ug/mL in PBS. Then, plates were washed three times with wash buffer (PBS, pH 7.4, with 0.05% Tween 20) and was blocked for 1 hour at room temperature with PBS containing 5% nonfat milk powder. After washing, plates were coated for 3 hours at room temperature with the samples diluted 1:200 in sample diluent (PBS with 1% bovine serum albumin) and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg/mL of BDNF. Plates were washed again and was added a biotinylated anti-BDNF antibody at 0.2 ug/mL, which was incubated for 2 hours at room temperature. After washing, the incubation with streptavidin-peroxidase conjugate (diluted 1:200 in sample diluent) for 20 min at room temperature was performed. After, plates were washed and incubated with the substrate for 20 minutes at room temperature. Finally, the stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) was added and the amount of BDNF was determined by absorbance at 450 nm. The standard curve demonstrated a direct relationship between optical density (OD) and BDNF concentration.

#### Statistical Analysis

Analysis was performed using SPSS Version 20.0. Demographic and clinical characteristics were analyzed using chi-square and ANOVA test as indicated. Descriptive analyses are presented as mean ± SD or median (interquartile range)

and  $p$ -values  $< 0.05$  were considered significant. Cytokine levels showed a non-Gaussian distribution and were analyzed with appropriate tests as indicated in tables; Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney test. Relationships between variables were assessed with Spearman rank correlation coefficient.

### 3. RESULTS

We included a total of 62 subjects in the study, 30 with diagnosis of bipolar disorder and 32 healthy controls. Demographic and clinical characteristics, as well as measures of symptom severity are summarized in Table 1. The groups were not significantly different regarding gender, age, ethnicity and years of education. Patients with BD had an average length of illness of 5,1 years. Regarding BD subtype, more than two-thirds of the sample had a type 1 diagnosis. Seventy percent of our sample was medicated at the baseline and more than 50% were taking mood stabilizers. Only 3 subjects in each group were receiving treatment to a medical illness, mostly respiratory diseases. Regarding psychiatric comorbidity, three patients met criteria for substance abuse, but they were abstinent at the time of collection of the blood sample. Of the 30 patients in the sample, 14 (almost 50%) met criteria for comorbid diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), which is in line with the literature, that suggests rates of comorbidities between bipolar disorder and ADHD between 22 and 98% (Singh et al., 2006; Nelson et al., 2013).

There were no significant differences between levels of IL-6, IL-10 and BDNF between patients with pediatric BD and healthy controls (figure 1). We also found no

significant correlations between IL-6, IL-10 and BDNF with clinical and metabolic variables, including age, BMI, IQ, fasting glucose and lipid profile (Table 2).

#### 4. DISCUSSION

This is the first study that examines IL-6 and IL-10 levels and the second examining BDNF levels in children and adolescents with BD compared with healthy controls. Our findings demonstrated that there are no significant differences between BD and controls in IL-6, IL-10 and BDNF levels, suggesting that bipolar disorder in children and adolescents is not associated with changes in inflammatory markers and neuroplasticity.

Only one previous study examined the association of IL-6, hsCRP and BDNF with symptom severity in a sample of 30 adolescents with BD. The study did not include a healthy control group for between-group comparisons, however, the authors found that manic symptom severity was significantly associated with hsCRP. Nevertheless, the association was reduced to a trend after controlling for obesity (Goldstein et al, 2011). Another study found significantly lower levels of BDNF in 26 pediatric patients with BD in acute episode compared to 21 controls. In their sample, BDNF increased after 8 weeks of treatment, however, they measured BDNF mRNA levels in the lymphocytes and protein levels of BDNF in platelets (Panday et al, 2008).

The literature involving biomarkers in pediatric population with psychiatric disease is scarce and there is a discussion about the reproduction of the results found in adults

in children and adolescents. There is some evidence that healthy children markedly differ from adults in cytokine production after stimulation with antigens (Lilic et al., 1997). A recent review about cytokines in adolescents with depression demonstrated age-specific characteristics of the immune and inflammatory system and concluded that there may be differences in the neurobiology of depression among adults and adolescents. Some differences may be influenced by developmental issues, hormonal changes, stress and trauma history that have more direct effect on young people (Mills et al., 2013). In this sense, animal models in rodents have shown that BDNF undergoes major changes during development (Bath et al., 2013). Also, changes of cytokines in this population may be subtle, requiring a larger sample size to be detected.

On the other hand, studies of peripheral biomarkers in the pediatric populations can minimize biases that are common in studies with adult samples. For example, medical comorbidities are potential confounders. Moreover, children and adolescents with BD have shorter disease and therefore are not subject to metabolic changes that are commonly caused by the chronic use of medications. Similarly, use of tobacco and other substances are less prevalent in pediatric population.

This study was carefully conducted. Patients underwent a complete clinical investigation, with experts in child and adolescent psychiatry. Although patients were not fasted, and the samples were not collected in the morning, they were always collected at the same time (between 16 and 18 p.m.), minimizing circadian differences in cytokines levels. Some potential confounders were investigated (like BMI, lipid profile and medical comorbidities) and the correlations showed no

statistical significance. Maybe the major limitation of the current study is the use of medications for nearly all patients (70%). Mood stabilizers have predominantly an anti-inflammatory action with immunomodulatory effects in BD (Kang et al., 2012; Xuan et al., 2012) and increase the levels of BDNF in rat brain (Hashimoto et al., 2002; De Souza et al., 2011). More than 50% of the sample was taking lithium or valproate at the time of blood collection. Boufidou and colleagues showed that BD patients under chronic lithium treatment had significantly lower numbers of IL-6 and IL-10 secreting cells compared to healthy controls (Boufidou et al., 2004). Similarly, antipsychotics may also affect the production of cytokines and 43,7% of the sample was taking second-generation antipsychotics. However, two recent researches that measured the impact of antipsychotics and mood stabilizers on cytokine production in-vitro showed that antipsychotics as a group had no influence on IL-6 and between the mood stabilizers, only lithium increased IL-6 levels consistently (Hummerich et al., 2011; Hummerich et al., 2013). Another important factor is the low average score in rating scales, showing that your patients were not severely symptomatic. In adults, the strongest evidence of changes in cytokines and BDNF is in periods of acute illness. The bipolar disorder in children and adolescents has different characteristics from the adult, with mixed and longer episodes. The small sample size could also be a limitation, however, previous studies had similar sizes and were able to show significant differences between groups.

Considering the current lack of studies in pediatric BD, our results contribute to the understanding of the role of BDNF and cytokines in this population. This research is the first step of a cohort that aims to follow children and adolescents with the

diagnosis of bipolar disorder into adulthood. The longitudinal follow-up will certainly help to clarify many questions that remain unanswered.



**Table 1. Descriptive Demographic and Clinical Characteristics**

	BD (n=30)	HC (n=32)	p-value
Gender (M/F proportion)	17/13	15/17	0,441
Age (mean/St.Deviation)	13,16/ 2,46	12,18/ 3,38	0,027
Ethnicity			
Caucasian	22 (73,3%)	27 (84,3%)	0,114
African	4 (13,3%)	0	
Coloured	3 (10%)	5 (15,6)	
Other	1 (3,3)	0	
Years of schooling (mean/St.Deviation)	6,8/ 2,10	5,6/ 3,06	0,051
Intelligence Quotient (IQ) (mean/St.Deviation)	100,1/ 12,2	86,4/ 14,1	0,217
Body mass index	21,5	19,8	
BD Family History	46,7%	3,1%	0,000
YMRS score (mean)	9,4	0,06	0,000
CDRS score (mean)	32,24	17,71	
CGAS score (mean)	59,15	90,15	

---

Bipolar Disorder Subtype	
BD-I	20 (66,7%)
BD-II	4 (13,3%)
BD-NOS	6 (20%)

---

Current Medication Use	
Mood Stabilizers	17 (56,7%)
Second-generation antipsychotic	13 (43%)

---

Medical Comorbidities	3 (12,5%)
-----------------------	-----------

---

Psychiatric Comorbidities	17 (56,7%)
ADHD	14
OCD/CD	9
Anxiety disorders	10
Substance Use	3

---

YMRS: Young Mania Rating Scale. CDRS: Children’s Depression Rating Scale. CGAS: Children’s Global Assessment Scale. ADHD: Attention-Deficit/Hiperactivity Disorder. OCD:. CD: conduct disorder.

**Table 2: Correlations (Pearson Correlation)**

	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>BDNF</b>
Age	,048	- ,081	,120
IQ	- ,126	- ,077	- ,071
Glicemya	,207	,177	- ,136
Total Cholesterol	- ,268	- ,308	,184
HDL Cholesterol	- ,008	,098	- ,212
Triglycerides	- ,115	- 0,69	-,002
BMI	- 0,03	- 0,132	,197

**Figure 1. Mean of serum levels of IL-6, IL-10 and BDNF for bipolar patients and control group**

Figure 1.1: Serum levels of IL-6

IL- 6 – BD (2,3917) X HC (2,1263)  $p(,209)$

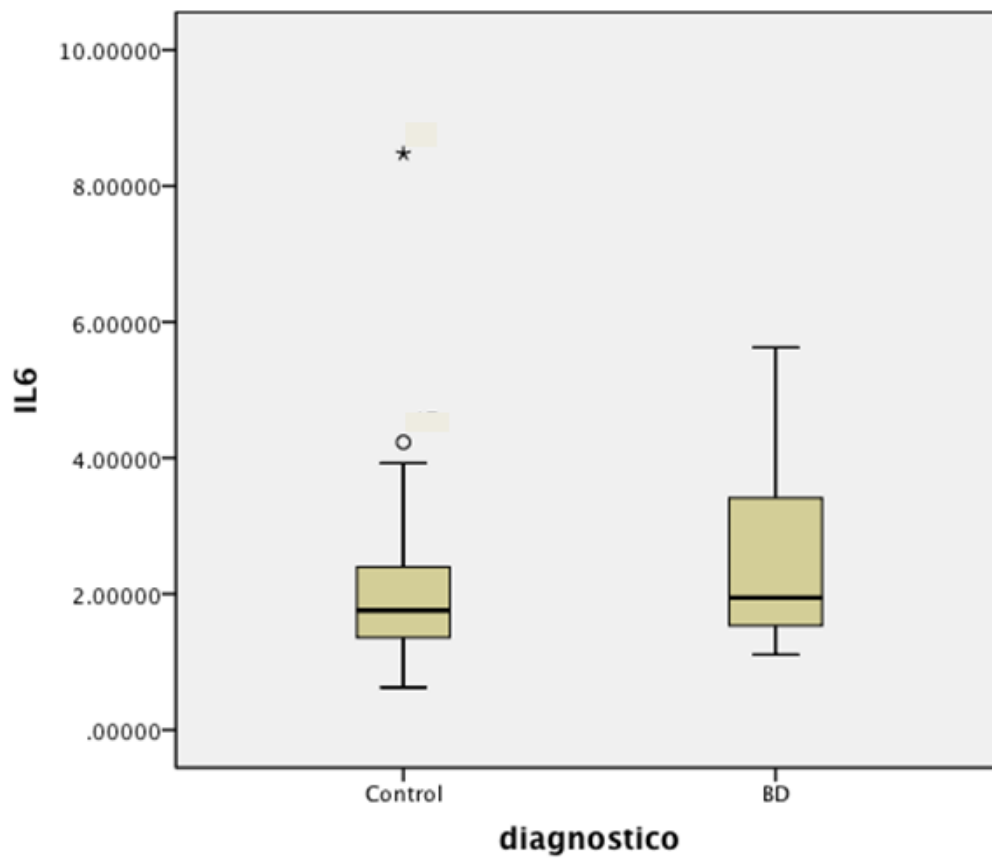


Figure 1.2. Serum levels of IL-10

IL-10 – BD (1,2203) X HC (1,1624)  $p$  (.877)

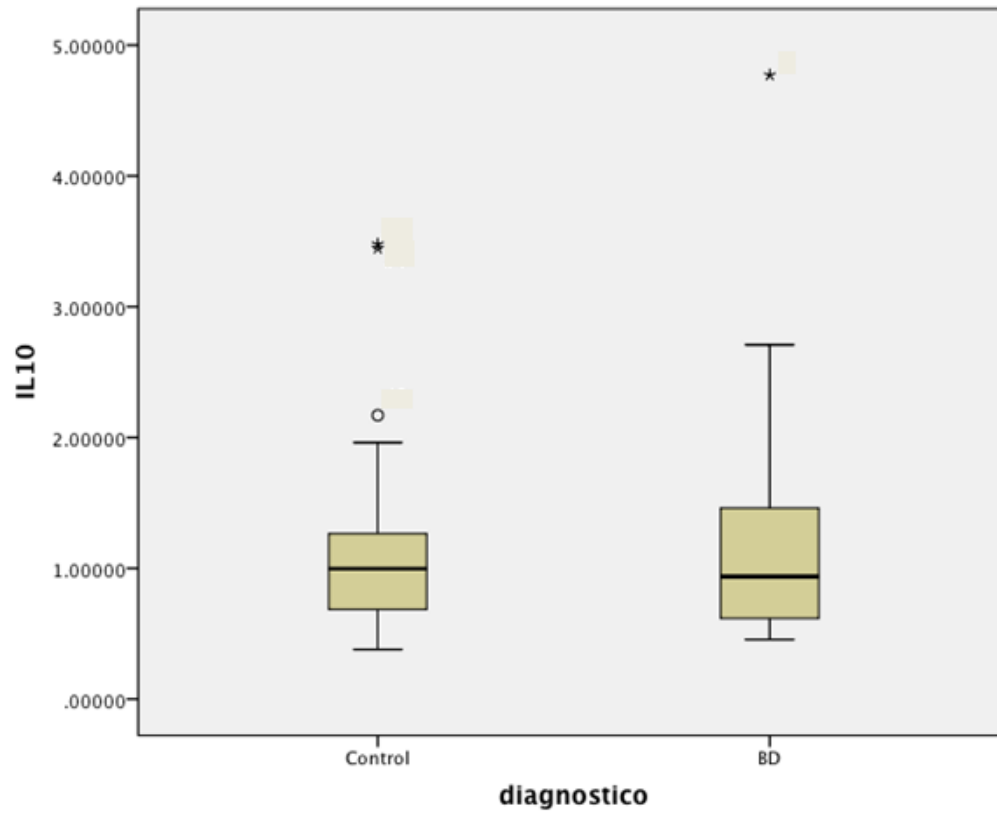
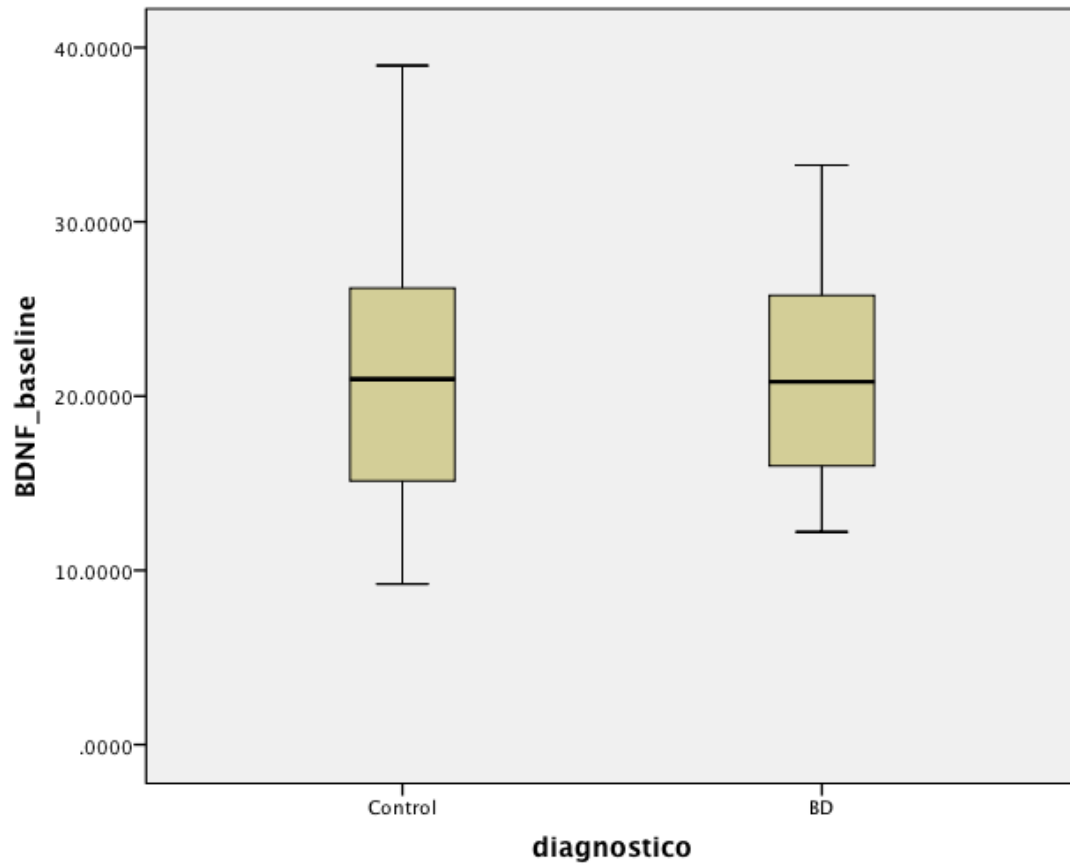


Figure 1.3. Serum levels of BDNF

BDNF – BD (21,5185) X HC (21,5901)  $p$  (.879)



## References

Barbosa G.A., Dias M.D., Gaião A.A., Di Lorenzo W.F., 1997. Escala para avaliação de depressão em crianças – revisada (CDRS-R): uma análise exploratória. *Rev Neuropsiquiatr Inf Adolesc.* 5:15-18.

Bath K.G., Schilit A., Lee F.S, 2013. Stress effect on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress. *Neuroscience.* 239, 149-156.

Birmaher B, 2007. Longitudinal course of pediatric bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 164, 537-9.

Boufidou F., Nikolaou C., Alevizos B., Ioannis I.A., Christodoulou G.N., 2004. Cytokine production in bipolar affective disorder patients under lithium treatment. *J Affect Disord.* 82, 309-313.

Brietzke E., Stertz L., Fernandes B.S., Kauer-Sant'Anna M., Vargas A.E., Chies J.A., Kapczinski F., 2009. Comparison of cytokines levels in depressed, manic and euthymic patients. *J Affect Disord.* 116, 214-217.

De Souza R.T., Van de Bit M.Y., Diniz B.S., Ladeira R.B., Portela L.V., Souza D.O., Forlenza O.V., Gattaz W.F., Machado-Vieira R., 2011. Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. *Neurosc Lett.* 494, 54-56.

Fernandes B.S., Gama C.S., Ceresér K.M., Yatham L.N., Fries G.R., Colpo G., de Lucena D., Kunz M., Gomes F.A., Kapczinski F., 2011. Brain-derived neurotrophic

factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: A systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatric Res.* 45, 995-1004.

Goldstein B.I., Kemp D.E., Soczynska J.K., McIntyre R.S., 2009. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psychiatry.* 70, 1078 -90.

Goldstein B.I., Collinger K.A., Lotrich F., Marsland A.L., Gill M.K., Axelson D.A., Birmaher B., 2011. Preliminary findings regarding proinflammatory markers and brain-derived neurotrophic factor among adolescents with bipolar disorders. *J Child and Adolesc Psychopharmacol.* 21, 479-484.

Guy W., 2000. Clinical Global Impressions (CGI) Scale. In: *Mental Health Status, Functioning and Disabilities Measures.* APA Task Force for the Handbook of Psychiatric Measures.

Hashimoto R., Takei N., Shimazu K., Christ L., Lu B., Chuang De-M., 2002. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: An essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacol.* 43, 1173-9.

Himmerich H., Schonherr J., Fulda S., Sheldrick A.J., Bauer K., Sack U., 2011. Impact of antipsychotics on cytokine production in-vitro. *J Psychiatric Res.* 45, 1358-1365.

Himmerich H., Hamer H., Merge R., Schonherr J., Petersein C., Munzer A, Kirkby K.C, Bauer K, Sack U, 2013. Impact of mood stabilizers and antiepileptic on cytokine production in-vitro. *J Psychiatric Res.* 47:1751-1759.



Joshi G., Wilens T., 2009. Comorbidity in pediatric bipolar disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 18, 291-319.

Kang K., Kim Y.J., Kim Y.H., Roh J.N., Nam J.M., Kim P.Y., Ryu W.S., Lu S.H., Yoon B.W., 2012. Lithium pretreatment reduces brain injury after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurological Res.* 34, 447-54.

Kapczinski F., Dal-Pizzol F., Teixeira A., Magalhães P., Kauer-Sant'Anna M., Klamt F., Moreira J., Bittencourt M., Fries G., Quevedo J., Gama C., Post R., 2010. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatric Res.* 45, 1-6.

Kaufmann J., Birmaher B., Brent D., Rao U., Flynn C., Moreci P., Williamson D., Ryan N., 1997. Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children – present and lifetime version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 36, 980-988.

Lilic D, Cant A.J, Abinun M, Calvert J.E, Spickett G.P, 1997. Cytokine production differs in children and adults. *Pediatric Res* 42:237-240.

Maes M., Ruckoanich P., Chang Y.S., Mahanonda N., Berck M., 2011. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry.* 35, 769-83.

Mills N.T., Scott J.G., Wray N., Cohen-Woods S., Baune B.T., 2013. Research Review: The role of cytokines in depression in adolescents: a systematic review. *J Child Adolesc Psychiatry.* 54, 816-835.

Modabbernia A., Taslimi S., Brietzke E., Ashrafi M., 2013. Cytokine alterations in bipolar disorder: A meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry.* 74, 15-25.

Munkholm K., Viberg M., Kessing L.V., 2013a. Cytokines in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord.* 144, 16-27.

Munkholm K., Brauner J.V., Kessing L.V., Vinberg M, 2013b. Cytokines in bipolar disorder vs healthy control subjects: A systematic review and meta-analysis. *J Psychiatric Res.* 47, 1119-1133.

Nelson J.C., 2013. Bipolar disorder and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder comorbidity in children and adolescents: evidence-based approach to diagnosis and treatment. *J Clin Psychiatry.* 74, 628-9.

O'Brien S.M., Scully P., Scott L.V., Dinan T.G., 2006. Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Disord.* 90, 263-267.

Panday G.N., Rizavi H.S., Dwivedi Y., Pavuluri M.N., 2008. Brain-derived neurotrophic factor gene expression in pediatric bipolar disorder: effects of treatment and clinical response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 47, 1077-1085.

Pandey G.N., Dwivedi Y., Rizavi H.S., Ren X., Zhang H., Pavuluri M.N., 2010. Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34, 645-651.

Poznanski E.O., Grossman J.A., Buchsbaum Y., Banegas M., Freeman L., Gibbons R., 1984. Preliminary studies of the reliability and validity of the children's depression rating scale. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 23, 191-197.

Rosa A., Cuesta M.J., Fatjó-Vila M., Peralta V., Zarzuela A., Fañanás L., 2006. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with risk for psychosis: evident from a family-based association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 141B, 135-138.

Sing M.K., DelBello M.P., Kowatch R.A., Strakowski S.M., 2006. Co-occurrence of bipolar and attention-deficit hyperactivity disorders in children. *Bipolar Disord.* 8, 710-720.

Vilella J.A., Crippa J.A., Del-Ben C.M., Loureiro S.R., 2005. Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. *Braz J Med Biol Res.* 38, 1429-1439.

Xuan A., Long D., Li J., Ji W., Hong L., Zhang M., Zhang W., 2012. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats. *Life Sci.* 90, 463-8.

Walz J.C., Magalhães P.V., Giglio L.M., Cunha A.B., Stertz L., Fries G.R., Andreazza A.C., Kapczinski F., 2009. Increased serum neurotrophin-4/5 levels in bipolar disorder. *J Psychiatric Res.* 43, 721-723.

World Medical Association, 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 310, 2191-2194.

Young R.C., Biggs J.Y., Ziegler V.E., Meyer D.A., 1978. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry*. 133, 429-425.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Enquanto os estudos em adultos bipolares apontam cada vez mais para a interação do sistema imune e neurotrofinas com a fisiopatologia da doença, nossos resultados sugerem que citocinas inflamatórias e BDNF possam ter um comportamento diferente na população pediátrica com THB.

Este é o terceiro artigo que se propôs a estudar biomarcadores em crianças e adolescentes com THB, sendo o primeiro a comparar níveis de interleucinas com um grupo controle. A escassez da literatura sobre o tema nos faz inferir algumas possibilidades. Seria o sistema imune desta população diferente da população adulta? As questões hormonais, seriam importantes? A ausência de comorbidades clínicas, cuja prevalência no THB é sabidamente muito frequente, faria diferença na dosagem dos biomarcadores?

Uma revisão sistemática publicada por Mitchell & Goldstein sobre a inflamação em transtornos neuropsiquiátricos em crianças e adolescentes concluiu que as evidências preliminares apontam para um aumento da atividade inflamatória nesta população. Porém, segundo os autores, as evidências são robustas apenas para o autismo, que é uma doença desenvolvimental, com fisiopatologia muito diferente dos transtornos psiquiátricos. No que tange o THB o autor cita apenas 2 estudos, uma auto-referência (Goldstein et al., 2011), que não conseguiu demonstrar aumento a atividade inflamatória na amostra e um segundo artigo que avaliou a prole de pais com THB e identificou a expressão de genes pro-inflamatórios em

100% da prole que desenvolveram transtorno de humor. Um estudo de revisão sobre o papel das citocinas especificamente na depressão em adolescentes sugeriu que a neurobiologia do transtorno nesta população possa ser diferente em relação aos adultos. Por outro lado, Pandey et al (2010) examinaram a expressão gênica em linfócitos e a expressão de proteínas em plaquetas do BDNF em pacientes adultos e pediátricos deprimidos sem uso de medicação. O resultado foi semelhante entre os dois grupos, com diminuição dos níveis de BDNF, sugerindo que o comportamento desta neurotrofina não difere entre adolescência e a vida adulta.

Certamente, a principal limitação deste estudo é o fato de 70% dos pacientes estarem medicados. Ambos os estudos de Pandey (Pandey et al, 2008 e 2010) que mostraram alterações do BDNF foram realizados com pacientes sem uso de medicação e em episódios agudos de doença. Porém, na nossa realidade de um serviço terciário, é impensável a possibilidade de pacientes drug-free.

O THBia é um doença grave, associada a prejuízos desenvolvimentais. Recentemente, um artigo que procurou descrever as hospitalizações por transtornos mentais na população pediátrica encontrou o THB ocupando o 2º lugar em frequência e custo das internações, perdendo apenas para a depressão (Bardach et al., 2014). O ProCAB (Programa de Crianças e Adolescentes) trata-se de um estudo de coorte que pretende acompanhar crianças e adolescentes com THB até a vida adulta. Este acompanhamento longitudinal poderá ajudar não apenas no entendimento da fisiopatologia da doença, mas em medidas mais efetivas que possam auxiliar no tratamento, evitando os danos já tão conhecidos desta grave e incapacitante doença.

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(RESOLUÇÃO Nº 196/96 - CNS)

A proposta deste Programa é sistematizar o atendimento, o diagnóstico e o estabelecimento de estratégias de intervenção para o Transtorno do Humor Bipolar em Crianças e Adolescentes.

Caso eu aceite que meu dependente participe deste protocolo, estou ciente de que terei que responder a uma série de entrevistas semi-estruturadas e escalas de avaliação que poderão levar cerca de uma hora cada. Quando necessário poderá ser colhido material sanguíneo para estudos bioquímicos ou genéticos desde que não estejam envolvidos riscos para a saúde do meu filho(a). O material poderá ser congelado por até 5 anos, para eventuais análises em projetos futuros. Os dados resultantes destas entrevistas e escalas poderão ser utilizados para fins de estudos com destruição da identificação. Caso a utilização desse material seja enquadrada em algum novo projeto, sei que o novo projeto deverá passar novamente por análise da Instituição adequada (Comitê de Ética e Pesquisa), para receber aprovação específica. Também estou ciente de que poderei ser novamente contatado para dar meu novo consentimento.

O potencial benefício para a sociedade é que este programa pode incrementar o conhecimento sobre estes transtornos. Também meu filho (a) estará recebendo avaliação e tratamento.

Eu entendo que a participação do meu dependente é voluntária e ligada ao meu consentimento. Ele poderá receber atendimento neste mesmo hospital ou na rede de saúde da comunidade, caso eu decida não participar.

Eu entendo que as informações produzidas nesta tarefa serão mantidas em lugar seguro, codificadas e a identificação só poderá ser realizada pelo pessoal envolvido diretamente com o projeto.

Caso o material venha a ser utilizado para publicação científica ou atividades didáticas, não serão utilizados nomes que possam vir a identificar meu dependente.

Eu entendo que poderei obter mais informações com a Dra. Silzá Tramontina, pelo telefone 2101-8272, que está apta a solucionar minhas dúvidas. Aceito que serei informado de qualquer conhecimento significativo descoberto durante este projeto o qual poderá influenciar a minha participação na sua continuidade.

Eu compreendo que poderei solicitar o desligamento do meu dependente do presente projeto a qualquer momento.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Pesquisador que obteve o consentimento

\_\_\_\_\_  
Nome do Representante Legal