

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

TESE DE DOUTORADO

**VULNERABILIDADE VS. RESILIÊNCIA NO TRANTORNO BIPOLAR: AVALIAÇÃO
DE FATORES CLÍNICOS, COGNITIVOS, PSICOSSOCIAS E BIOLÓGICOS EM
FAMILIARES DE 1º GRAU**

Mirela Paiva Vasconcelos Moreno

Orientador: Marcia Kauer Sant'Anna

Porto Alegre, 30 de Abril de 2015

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

TESE DE DOUTORADO

**VULNERABILIDADE VS. RESILIÊNCIA NO TRANTORNO BIPOLAR: AVALIAÇÃO
DE FATORES CLÍNICOS, COGNITIVOS, PSICOSSOCIAS E BIOLÓGICOS EM
FAMILIARES DE 1º GRAU**

Mirela Paiva Vasconcelos Moreno

Orientador: Marcia Kauer Sant'Anna

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

Porto Alegre, 30 de Abril de 2015

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Márcia Sant'Anna, pelo aprendizado, constante estímulo, inspiração, exemplo, cuidado, carinho, e, acima de tudo, pela confiança! Sinto-me, desde o período de Residência Médica, privilegiada pela oportunidade desse convívio!

À Prof.^a Adriane Rosa, pela excepcional ajuda na reta final dessa pesquisa, auxiliando na análise dos resultados e durante a elaboração dos artigos, assumindo um papel de coorientadora. Obrigada pela atenção e dedicação!

Ao Prof. Flávio Kapczinski, pelos ensinamentos, pela confiança, e pelo exemplo de amor à pesquisa!

Aos Professores Clarissa Gama, Pedro Magalhães, Maurício Kunz e Keila Cereser, pelo exemplo, pelo aprendizado e pelo carinho!

Aos queridos Gabriel Fries e Joana Bücker, pela presença em momentos fundamentais, pela atenção e dedicação inigualável a este trabalho!

À Dra. Florencia M. Barbé-Tuana (Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática - Departamento de Bioquímica-UFRGS), por ter viabilizado as análises de telômeros para essa pesquisa!

Aos colegas que acreditaram no projeto e participaram da equipe ao longo do trabalho de coletas: Adam Fijtman, André Luiz Schuh, Barbara Tietböhl Santos, Ives Cavalcante, Juliana Sartori, Kelen Burke, Letícia Czepielewski, Gabriel Fries, Carol Gubert e Pâmela Ferrari, sem cuja participação esse trabalho não seria possível! Em especial, agradeço a incansável dedicação da Barbara Tietböhl Santos!

Aos colegas, Mireia Sulzbach e Pedro Goi, agradeço pela amizade, companheirismo e apoio! O convívio com vocês foi um grande presente!

Aos demais colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular do Hospital de Clínicas de

Porto Alegre, pela amizade e trabalho em equipe!

Às instituições que possibilitaram este trabalho: UFRGS, HCPA, CAPES e CNPq.

Aos meus pais, Stela e Silvio, e irmãos, Rodney, Rafael e Monique, pelo amor, carinho, cuidado e por sempre terem me ensinado a valorizar e buscar o conhecimento!

À minha família, marido e amigos que sempre acreditaram em minha capacidade, apoiaram minhas iniciativas e estimularam-me a progredir ! Agradeço, em especial, à Rachel Lorenz e ao Rafael Moreno, pela confiança, presença e amor!

Ao querido Mateus, meu bebê, que participou comigo dessa jornada nesses últimos meses!

A Deus, sempre presente!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	7
Resumo	8
Abstract	10
1 - Apresentação	12
2 – Introdução	14
2.1 Transtorno Bipolar	14
2.1.1 Funcionalidade e Cognição e Transtorno Bipolar	16
2.1.2 Inflamação e Transtorno Bipolar	17
2.1.3 Estresse Oxidativo e Transtorno Bipolar	18
2.1.4 Neurotrofinas e Transtorno Bipolar	19
2.1.5 Envelhecimento Precoce e Transtorno Bipolar	21
2.1.6 Conceitos de Estadiamento no Transtorno Bipolar	23
2.2 Familiares de Primeiro Grau de Pacientes com Transtorno Bipolar - Risco, Biomarcadores, Cognição e Funcionalidade	26
2.3 Conceitos de Endophenótipos	29
3 - Justificativa e Objetivos	32
5 – Artigos	34
5.1 Artigo 1: “Comparison of cognitive performance and psychosocial functioning in patients with bipolar disorder, siblings and healthy controls.”	34
5.2 Artigo 2: “Telomere length, oxidative stress, inflammation and BDNF levels among siblings	58

of patients with bipolar disorder: implications for accelerated cellular aging”.

6 - Discussão e Considerações Finais	88
7 – Referências da Tese	92
8 - Anexos – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	112

Lista de Abreviaturas da Tese*:

3-NT: 3-Nitrotirosina

BD: Transtorno Bipolar (do inglês, *Bipolar Disorder*)

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

CAT: Catalase

CCL11: Eotaxina-1 (do inglês, *C-C motif chemokine 11*)

CCL24: Eotaxina-2 (do inglês, *C-C motif chemokine 24*)

FAST: Escala Breve de Funcionalidade (do inglês, *Functioning Assessment Short Test*)

GPx: Glutaciona Peroxidase

GR: Glutaciona Redutase

GSH: Glutaciona

GST: Glutaciona S-Transferase

IL-10: Interleucina-10

IL-6: Interleucina-6

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido Dismutase

TB: Transtorno Bipolar

TNF-a: Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*)

*cada artigo tem sua lista específica de abreviaturas.

Resumo:

Evidências apontam que o transtorno bipolar (TB) é uma doença multifatorial associada a alterações em neurotrofinas, em processos inflamatórios, em parâmetros cognitivos e no funcionamento psicossocial. Além disso, constatou-se que no TB há sinais de um processo de envelhecimento acelerado, como, por exemplo, o encurtamento de telômeros. O TB é uma doença com alto componente de herdabilidade. Dados apontam para a existência de alterações neurobiológicas em indivíduos não afetados com risco genético para TB, isto é, familiares de 1º grau. Portanto, o objetivo deste estudo foi examinar marcadores biológicos, cognitivos e de funcionamento em pacientes com TB, seus irmãos e controles saudáveis. Os resultados do estudo desenvolvido para esta tese estão agrupados em dois artigos : 1) “Comparação do desempenho cognitivo e funcionamento psicossocial em pacientes com transtorno bipolar, irmãos e controles saudáveis” e 2) “Comprimento de telômeros, estresse oxidativo, inflamação e níveis de BDNF entre irmãos de pacientes com transtorno bipolar: implicações para o envelhecimento celular acelerado”. No primeiro artigo, relatamos os resultados da avaliação do funcionamento psicossocial e dos testes neuropsicológicos. No segundo artigo, apresentamos dados sobre níveis séricos de neurotrofinas, interleucinas, quimiocinas, marcadores de estresse oxidativo e comprimento dos telômeros. Ambos reforçam a ideia de que traços ou alterações neurobiológicas estão presentes de forma atenuada em familiares de pacientes com TB. Resultados sugerem que irmãos não afetados podem apresentar sinais de envelhecimento precoce (encurtamento de telômeros) e pior desempenho na funcionalidade psicossocial quando comparados com controles saudáveis. Os presentes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de marcadores em estudos de populações com risco genético e podem auxiliar em pesquisas que buscam identificar

endofenótipos. Pesquisas futuras são necessárias para melhorar o conhecimento nesta área, sendo de fundamental importância a realização de estudos prospectivos com longo tempo de seguimento.

Palavras chave: Transtorno Bipolar, Familiares de primeiro grau, telômeros, BDNF, funcionamento, cognição.

Abstract:

There is growing evidence that bipolar disorder (BD) is a multifactorial illness associated with alterations in neurotrophins, inflammation, cognitive and psychosocial functioning. Also, there is association between BD and signs of accelerated aging, such as telomeres shortening. The high heritability of BD has been shown through familial incidence. Rising evidence supports the existence of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD. Therefore, the aim of this study was to examine if there are differences in biological markers, cognitive performance and functioning between BD patients, their siblings and healthy controls. The results from this thesis are organized in two articles: 1) Comparison of cognitive performance and psychosocial functioning in patients with bipolar disorder, siblings and healthy controls and 2) Telomere length, oxidative stress, inflammation and BDNF levels among siblings of patients with bipolar disorder: implications for accelerated cellular aging. In the first study psychosocial functioning and a battery of neuropsychological tests were assessed. In the second study, we measured serum brain-derived neurotrophic factor, interleukins, chemokines, oxidative stress markers and telomere length. These studies reinforce the idea of functional and neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD. The results suggest that unaffected siblings may present accelerated aging features and poor functional performance compared to healthy controls. These findings are in line with the similar genetic background to patients with BD, and may contribute to development of prodromal markers or determining endophenotypes traits. Future prospective studies are needed to confirm and further understand the clinical meaning of these findings.

Key Words: Bipolar Disorder, first-degree relatives, telomeres, BDNF, cognition and functioning.

1 - Apresentação

O nosso grupo de pesquisa estudava estadiamento no transtorno bipolar (TB) em 2011, e um questionamento importante era a existência de um estágio latente ou não. A literatura também aumentava o foco em estudos das alterações biológicas em populações especiais como pacientes após primeiro episódio de mania, familiares, filhos e populações de alto risco para desenvolvimento de TB. Considerando o acesso que tínhamos aos pacientes e a seus irmãos por meio do ambulatório (Programa de atendimento ao transtorno bipolar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), tornou-se interessante entender quais alterações observadas nos pacientes também estariam presentes nos irmãos que não apresentavam o TB. Ainda que os estudos longitudinais pudessem trazer mais respostas, tal material poderia ser um passo inicial para guiar quais alterações poderiam ter relevância e diferença entre esses grupos.

Esta tese de doutorado foi desenvolvida entre os anos de 2011 a 2015 no Laboratório de Psiquiatria Molecular e no ambulatório do Programa de Transtornos do Afeto e Humor Bipolar (PROTAHBI), ambos localizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob orientação da Prof.^a Dra. Márcia Kauer Sant'Anna. Recebemos também colaborações de outros grupos de pesquisa, como as da Dra. Florencia M. Barbé-Tuana (Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática - Departamento de Bioquímica, UFRGS) e as colaborações dos Dra. Caterina del Mar Bonnín e Dr. Eduard Vieta (Bipolar Disorders Program, Institute of Neurosciences, Hospital Clinic, University of Barcelona) ambas as colaborações sob intermédio da Prof.^a Dra. Adriane R Rosa. A presente tese de doutorado resultou em dois artigos: 1) “Comparison of cognitive performance and psychosocial functioning in patients with bipolar disorder, siblings and healthy controls” e 2) “Telomere length, oxidative stress, inflammation and BDNF levels among siblings

of patients with bipolar disorder: implications for accelerated cellular aging”. Ambos serão apresentados no formato de artigo.

2 - Introdução

2.1 Transtorno Bipolar

Transtorno Bipolar é doença crônica e multifatorial caracterizada por alterações no humor, variando entre episódios de mania/hipomania e depressão. Há várias subclassificações possíveis para o TB, dentre elas podemos citar, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), como diagnósticos principais TB tipo I (depressão e mania), TB tipo II (depressão e hipomania) e TB não-especificado (NOS) (Kessler et al., 1994; Yatham et al., 2005; American Psychiatric Association, 2013). Na maioria dos casos, os pacientes com TB têm sintomas residuais de depressão persistentes por até um terço de vida (Judd et al., 2002), sendo a depressão a principal causa de incapacidade entre os pacientes. Além disso, eles comumente apresentam sintomas psicóticos, prejuízos no funcionamento, comprometimento da qualidade de vida e estigma (Geddes & Miklowitz, 2013). O TB está associado a altas taxas de mortalidade por suicídio e é considerado uma das doenças mentais mais incapacitantes. Segundo a Organização Mundial da Saúde, TB está entre as dez causas de maior incapacidade entre todas as condições médicas gerais (World Health Organization, 2004), sendo associada a altas taxas de prejuízo funcional, mesmo durante a remissão dos sintomas de humor (Yatham et al., 2005).

A prevalência do TB na população mundial está estimada em cerca de 0.5–2.4% para TB tipo I e (Bourdon et al., 1992) e 0.2–5.0% para TB tipo II (Kessler et al., 1994), e sua distribuição é semelhante entre os sexo feminino e masculino. Existe importante componente de herdabilidade no TB, que fica claro ao observarmos que o risco na população geral é em torno de 0,5 a 1,5%, enquanto em familiares de primeiro grau é 5 a 10% e em gêmeos monozigóticos é 40 a 70% (Craddock & Jones, 1999). Alguns estudos chegam a apontar taxas ainda mais altas, como 86% em um estudo inglês em gêmeos (McGuffin et al., 2003) e 93% em um estudo

populacional em gêmeos do mesmo sexo na Finlândia (Kieseppa et al., 2004). Em relação a comorbidades psiquiátricas, nos estudos clínicos, em média, metade dos pacientes com TB apresentam algum transtorno de ansiedade ou abuso de substâncias (McElroy et al., 2001).

As bases neurobiológicas subjacentes ao TB permanecem pouco esclarecidas. Há evidências de que o TB (especialmente o número de episódios ou tempo de doença) está associado a um processo progressivo de deterioração clínica, cognitiva, funcional e a sinais de envelhecimento neurobiológico precoce. Especula-se quais vias neuroquímicas podem estar associadas, visto que alterações em neurotrofinas, marcadores inflamatórios e estresse oxidativo já foram demonstradas. Estudos sugerem que a fisiopatologia está associada a alterações semelhantes às aquelas encontradas no estresse crônico, similar à carga alostática inadequadamente compensada, em que se encontram alterações em quimiocinas e citocinas inflamatórias, corticosteróides, neurotrofinas, função mitocondrial, e enzimas antioxidantes (Berk et al., 2011; Kapczinski et al., 2008). Os desfechos clínicos observados ao longo do curso do TB que sugerem progressão incluem a redução de intervalos interepisódio e a piora na capacidade de resposta ao tratamento, culminando em declínio funcional em áreas sociais, ocupacionais e econômicas. Assim, Kapczinski et al. (2009a), baseado em seu modelo de estadiamento da doença, ressalta a importância da detecção precoce, tratamento precoce e prevenção. Essas medidas podem ter o potencial para retardar a progressão, diminuir a gravidade ou mesmo prevenir a perda funcional (Berk et al, 2011;. Post et al, 2012). Até o momento, há, no entanto, relativa escassez de evidências sobre a real predição clínica dos marcadores neurobiológicos no TB. Os estudos de marcadores em seguimentos longitudinais de longo prazo no TB serão importantes para entender a correlação com sintomas e resposta ao tratamento. Da mesma forma, o estudo em familiares de primeiro grau ou populações de alto risco para desenvolver o TB pode contribuir com o melhor

entendimento do significado desses achados neurobiológicos para o desenvolvimento do TB e potenciais alvos de intervenção precoce.

2.1.1 Cognição, Funcionalidade e Transtorno Bipolar

O TB está associado a prejuízo social, ocupacional, econômico e de relacionamento interpessoal e familiar. O declínio no funcionamento psicossocial é marcado no TB, de forma que em estágios mais avançados da doença alguns pacientes podem necessitar de cuidado constante, tornando-se dependentes. As incapacidades funcionais do TB não se limitam a períodos sintomáticos, podendo permanecer ou até mesmo resultar em uma incapacidade sustentada (Gardner et al., 2006; Gonzalez-Pinto et al., 2010). Um estudo prospectivo mostrou que, depois de dois anos, 98% dos pacientes maníacos no primeiro episódio atingiram controle sintomático, enquanto apenas 38% deles atingiram recuperação funcional (Tohen et al., 2000). Portanto, o prejuízo funcional não necessariamente está vinculado aos sintomas vigentes (Tohen et al., 2000; Keck et al., 2004). Rosa et al. (2014), seguindo o modelo de estadiamento do TB, mostrou que pacientes em estágios tardios apresentam escores da escala FAST mais elevados que aqueles em estágios iniciais ou controles saudáveis.

Além de prejuízo na funcionalidade, estudos também mostram que pacientes com diagnóstico de TB podem apresentar déficits em diversas áreas da cognição. O prejuízo cognitivo na doença bipolar parece estar relacionado com a severidade da doença, com o número de episódios maníacos, com múltiplos episódios, com número de internações e com o tempo de doença (Martínez-Arán et al., 2007; Torres et al., 2007; Robinson & Ferrier, 2006). Estudos realizados após o primeiro episódio maníaco mostraram déficits em memória visual, memória verbal, e memória de trabalho (Barrett et al, 2009;. Hill et al, 2009; Torres et al, 2010). Os

prejuízos em funções executivas, atenção e memória têm sido relatados em pacientes bipolares, mesmo quando eles estão eutímicos (Martínez-Arán et al, 2007;. Mur et al, 2009; Torres et al, 2007; Mackala et al., 2014).

2.1.2 Inflamação e Transtorno Bipolar

Citocinas são proteínas liberadas por células do sistema imune e são importantes mediadores do processo inflamatório. O papel da inflamação em doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas já está bem definido. No entanto, também é crescente o interesse no papel de processos inflamatórios em doenças neuropsiquiátricas, classicamente na depressão e na esquizofrenia e, mais recentemente, no TB (Haroon et al., 2012).

No TB, os episódios de humor têm sido caracterizados como estados pró-inflamatórios, com aumento principalmente das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Em episódios depressivos (Ortiz-Domínguez et al.,2007; O'Brien et al., 2006; Goldstein & Young, 2013) e maníacos (Maes et al., 1995; Brietzke et al., 2009; Goldstein & Young, 2013) há aumento de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , enquanto em períodos de eutimia há achados apontando semelhança entre pacientes e controles saudáveis (Brietzke et al., 2009; Dickerson et al.,2007; Tsai et al., 1999 Goldstein & Young, 2013). No entanto, estudos também descrevem aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes eutímicos, sobretudo naqueles com doença em estágios mais avançados, com vários anos de doença (Kauer-Sant'Anna et al., 2009). Estudos preliminares também mostram que pode existir correlação entre níveis de interleucinas e severidade de sintomas (Tsai et al., 2001; Brietzke et al., 2009; Dickerson et al.,2007). Além disso, há indícios de que o uso de agentes como lítio, valproato e antipsicóticos

estão associados à redução de citocinas pró-inflamatórias, mas esses achados são controversos (Goldstein & Young, 2013).

Ademais, tem-se investigado a inflamação como possível fator associado à neuroprogressão, uma vez que algumas citocinas têm o potencial de gerar toxicidade e morte por apoptose em células da glia (Magalhães et al., 2012a). Em artigo de revisão, Bauer et. al. (2014) encontrou resultados os quais sugerem que níveis elevados de citocinas inflamatórias periféricas, estresse oxidativo e redução de níveis de fatores neurotróficos estavam associados a pior desempenho cognitivo em pacientes com TB.

2.1.3 Estresse oxidativo e Transtorno Bipolar

Estresse oxidativo pode ser compreendido como desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes que pode levar ao dano a lipídios, a proteínas, a carboidratos e ao DNA (Pfaffenseller et al., 2013). O estado oxidativo pode ser causado tanto por elevação de agentes oxidantes, quanto por redução de agentes anti-oxidantes (Magalhães et al., 2012a; Pfaffenseller et al., 2013). O cérebro é especialmente suscetível ao dano oxidativo, visto que o alto consumo de oxigênio aumenta a produção de radicais livres e também porque o cérebro possui baixo potencial antioxidante (Olmez et al., 2012). Durante a cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, espécies reativas de oxigênio são liberadas e, se não adequadamente neutralizadas por agentes antioxidantes, poderão gerar o dano. Além disso, estudos recentes sugerem que no TB há disfunção mitocondrial (Berk et al., 2011). Os agentes antioxidantes podem ser de origem enzimática, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutiona peroxidase (Gpx), ou de origem não enzimática (Halliwell, 2011), esses últimos representados principalmente pela glutiona (GSH). No cérebro, predomina o sistema antioxidante não enzimático, e a GSH tem papel central nessa função.

No TB, foi verificado desbalanço entre o dano oxidativo e as defesas antioxidantes, de forma que se acredita que o estresse oxidativo participa da fisiopatologia desta doença (Magalhães et al., 2012a; Pfaffenseller et al., 2013). Estudos *postmortem* mostraram níveis reduzidos de GSH no córtex pré-frontal de pacientes (Gawryluk et al., 2011) e alterações da função mitocondrial no complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Andreazza et al, 2010). Andreazza et al. (2007a) sugere que há aumento de atividade oxidante em pacientes com diagnóstico de TB, tanto em episódios depressivos quanto em maníacos, mas não em pacientes eutímicos. Esses achados foram confirmados em outros estudos (Machado-Vieira et al, 2007; Kunz et al, 2008). Há, entretanto artigos que mostraram que a atividade da SOD estaria reduzida em episódios de humor e na eutimia (Selek et al, 2008; Ranjekar et al., 2003). Em estudo de caso-controle de base populacional, Magalhães et al. (2012b) concluiu ser possível que alguma forma de dano oxidativo esteja presente desde o início da doença, pois encontrou níveis aumentados de Carbonil (um marcador de dano proteico) em um grupo de pacientes em estágio inicial do TB, o que se verificou também em estágios mais adiantados, independentemente do tratamento em vigência ou do estado do humor. Uma metanálise mostrou que o óxido nítrico - espécie reativa de oxigênio, e o ácido tiobarbitúrico - marcador de dano lipídico- estão elevados no TB em todas as fases, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser considerado um traço da doença (Andreazza et al., 2008). Além disso, um estudo mostrou frequência elevada de dano ao DNA em pacientes com TB, que se correlacionava com a gravidade dos sintomas e estava possivelmente associado ao estresse oxidativo (Andreazza et al, 2007b).

2.1.4 Neurotrofinas e Transtorno Bipolar

Neurotrofinas são proteínas que interagem com diferentes receptores em diferentes locais, sendo especialmente importantes no desenvolvimento e na plasticidade do sistema nervoso central (SNC) (Chao et al., 2006). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é a neurotrofina mais amplamente distribuída no SNC e a mais estudada, sendo atribuído a estes efeitos relacionados à plasticidade sináptica, arborização dendrítica e conectividade neuronal (Post, 2007). No hipocampo e no córtex pré-frontal, verificou-se que o BDNF apresenta funções antidepressivas (Duman & Monteggia, 2006; Martinowich et al., 2007). Além de ser produzido por neurônios, o BDNF também pode ser produzido por macrófagos, linfócitos, células endoteliais e células do músculo liso, mas a maior parte do BDNF circulante origina-se a partir de neurônios do SNC e da glia (Lommatzsch et al., 1999; Gielen et al., 2003). Um estudo recente apontou que há correlação entre o BDNF do plasma e o BDNF do liquor (Pillai et al., 2010).

Há diversas pesquisas apontando redução dos níveis de BDNF no TB nos episódios depressivos e maníacos (Goldstein & Young, 2013), sendo que uma metanálise mostrou tamanhos de efeito de -0,81 para mania e -0,97 para depressão (Fernandes et al., 2011). Alguns estudos não encontraram diferenças consistentes entre pacientes eutímicos e controles saudáveis (Goldstein & Young, 2013). Entretanto, um estudo avaliou pacientes eutímicos em diferentes estágios da doença e mostrou que o BDNF está aumentado em estágios mais avançados, ao contrário de pacientes eutímicos em estágios iniciais da doença (Kauer-Sant'Anna et al., 2009). Esses achados abrem espaço para uma discussão atual (Magalhães et al., 2012a): o BDNF é apenas relacionado a estados agudos ou é um traço da doença? Mais estudos, principalmente estudos longitudinais, serão necessários para esclarecer a discussão; é possível, no entanto, que a neurotrofina tenha características tanto de estado como de traço.

Em relação ao tratamento, estudos demonstram que os níveis de BDNF podem variar conforme o uso de medicações. Estabilizadores do humor vêm se mostrando agentes capazes de elevar os níveis de BDNF, sendo o lítio uma das substâncias que tem a propriedade de aumentar o BDNF e promover neuroproteção (De Sousa et al., 2011; Machado-Vieira et al., 2009). Agentes com propriedades antidepressivas podem elevar os níveis de BDNF hipocampal (Post, 2007). Entretanto, um estudo encontrou aumento de BDNF em pacientes deprimidos após o tratamento, mas não em pacientes em episódios mistos ou maníacos nas primeiras semanas de tratamento (Grande et al., 2012). Pfaffenseller et al. (2013), em artigo de revisão, discutiu esses achados considerando que talvez isso possa indicar que episódios maníacos e mistos poderiam ser particularmente tóxicos quando comparados a episódios depressivos, e, por isso, precisariam de maior tempo para restabelecimento de níveis de BDNF.

2.1.5 Envelhecimento Precoce e Transtorno Bipolar

Telômeros são as extremidades dos cromossomos formados por complexos de proteínas e de DNA não codificante que compreendem centenas a milhares de repetições em tandem de TTAGGG (de Lange et al., 2005), que se encurtam a cada divisão mitótica das células normais (Bojesen, 2013). Assim, o comprimento dos telômeros reflete quantas divisões a célula sofreu (Bojesen, 2013). Quando o telômero chega a certo comprimento curto crítico, a célula perde a capacidade de dividir-se e entra na senescência (Nitta et al., 2011). Fatores como idade (Weischer et al., 2012), sexo (Fitzpatrick et al., 2011), obesidade (Njajou et al., 2012), tabagismo (Weischer et al., 2012) e estilo de vida (Cassidy et al., 2010; Sun et al., 2012) influenciam no comprimento dos telômeros (Hastie et al., 1990). Além disso, o comprimento do telômero também é determinado pela variação genética individual normal, a herdabilidade desta

característica varia entre 60% e 80% (Njajou et al., 2007; Atzmon et al., 2010). Bojesen (2013) destacou em artigo de revisão que o comprimento dos telômeros é um biomarcador bastante promissor, pois: (1) fornece uma medida quantitativa que é, teoricamente, intimamente relacionada com mecanismos biológicos básicos, como a proliferação, senescência e “imortalização” de células; (2) registra o número de divisões celulares passadas; (3) é reprodutível no indivíduo e altamente correlacionado nos tecidos; (4) está associado a estilos de vida adversos e a outros fatores de risco, incluindo idade e sexo.

O encurtamento dos telômeros está associado a risco aumentado de morte precoce na população em geral, mas não está claro se este é um fator causal ou um traço de risco (Bojesen, 2013). Telômeros curtos ou mutações em genes que codificam a telomerase também estão associados a várias doenças clínicas como disceratose congênita, doença hereditária causada por mutação deletéria de proteínas de telomerase, caracterizada por pigmentação da pele irregular, leucoplasia e aumento do risco de câncer (Savage & Bertuch, 2010). Além disso, pesquisas têm relacionado o encurtamento dos telômeros com doenças psiquiátricas. Simon et al. (2006) observou que há redução do comprimento dos telômeros de leucócitos periféricos em indivíduos com depressão unipolar e TB comparados com controles saudáveis (Simon et al., 2006).

Hartmann et al. (2010) mostrou que indivíduos com depressão, comparados com controles saudáveis, têm menor comprimento dos telômeros em leucócitos e que o tempo de doença e a gravidade dos sintomas não estavam associados ao comprimento dos telômeros. Wolkowitz et al. (2011), por sua vez, destacou que o número de episódios depressivos anteriores foi um determinante importante do encurtamento dos telômeros, e que a atividade da telomerase pré-tratamento estava significativamente elevada em indivíduos deprimidos quando comparados com

controles saudáveis (Wolkowitz et al., 2012). Um estudo mostrou que o TB tipo II está associado ao aumento de encurtamento de telômeros, relacionado com o número de episódios depressivos ao longo da vida, mas não com a duração da doença. O tratamento com lítio parece ter efeito positivo no comprimento do telômeros (Martinsson et al., 2013), sugerindo que lítio pode exercer efeito protetor sobre o envelhecimento precoce. Lima et al. (2015) confirmou recentemente que há encurtamento de telômeros no TB. Rizzo et al. (2014) publicou uma revisão sobre a teoria de transtorno bipolar como doença de envelhecimento acelerado, em que discutiu que o envelhecimento e a senescência podem contribuir para a busca de novos alvos moleculares para melhor compreender a fisiopatologia do TB, bem como para dar suporte à teoria da neuroprogressão no TB (Rizzo et al., 2014).

Ainda em relação a envelhecimento, a “C-C motif chemokine 11” (CCL11) é uma citocina pró-inflamatória, conhecida também como eotaxina-1, que vem sendo associada ao envelhecimento (Shurin et al., 2007). Villeda et al. (2011) mostrou em modelo animal um mecanismo no qual a toxicidade sistêmica pode ter efeitos diretos no hipocampo de ratos, avaliando efeitos da CCL 11 e da “C-C motif chemokine 24” (CCL 24). Este estudo sugeriu que a quimiocina CCL11 poderia prejudicar a plasticidade sináptica, a neurogênese e a cognição de forma semelhante ao observado no envelhecimento. No contexto do TB, essa quimiocina foi investigada recentemente por Magalhães et al. (2014), em uma amostra de base populacional de jovens, confirmando achados prévios que apontavam que a CCL11 pode desempenhar um papel no processo fisiopatológico do TB (Barbosa et al, 2013; Brietzke et al, 2009).

2.1.6 Conceitos de Estadiamento no Transtorno Bipolar

A história natural do TB apresenta-se com evolução bem menos favorável do que previamente se supunha, com melhora sintomática muitas vezes apenas parcial e prejuízo cognitivo persistente (Martínez-Arán et al., 2004a; Martínez-Arán et al., 2004b). Pesquisas revelam que o tempo de eutímia diminui ao longo do tempo enquanto a chance de recorrência de sintomas aumenta a cada novo episódio (Kessing et al., 1998, Kessing et al., 2004). A vulnerabilidade a fatores estressantes bem como a frequência dos episódios e a gravidade desses aumentam ao longo do tempo. O curso do TB não é igual em todos os casos, de forma que alguns pacientes apresentam múltiplos episódios, mas com boa recuperação e períodos de eutímia, enquanto outros pacientes já iniciam a doença com quadros graves e de difícil controle (Berk et al., 2007a; Kapczinski et al., 2009a). Portanto, o número de episódios não seria o único fator determinante, mais importante seria o grau de prejuízo persistente observado no período do interepisódio. Isso levaria em conta, além das características da doença, também as vulnerabilidades individuais.

Nos tópicos acima, foi citado que alterações de biomarcadores, alterações anatômicas no SNC, alterações cognitivas e de funcionalidade psicossocial evidenciam-se no TB a longo prazo. Baseado nesses achados, desenvolveu-se um dos conceitos de estadiamento no TB, que tem sido amplamente estudado e utilizado devido à grande aplicabilidade clínica e potencial predição de tratamento (Kapczinski et al., 2009a). Tal modelo divide-se em: Estágio Latente (alto risco para desenvolver TB), Estágio I (ausência de prejuízo relevante no período interepisódio), Estágio II (alterações clínicas e de biomarcadores no período interepisódio), Estágio III (prejuízo importante clínico e de biomarcadores no período interepisódio) e Estágio IV (prejuízo importante clínico e de biomarcadores no período interepisódio – nesse estágio, o paciente necessita de cuidador e perde a capacidade de autonomia e autocuidado) (Kapczinski et al.,

2009b). É importante ressaltar que os familiares de pacientes com diagnóstico de TB são considerados estágio latente devido à história familiar positiva.

Propostas anteriores de estadiamento foram sugeridas. McGorry et al. (2007) foi um dos precursores no estadiamento em doenças mentais, este autor acreditava que o estadiamento clínico seria especialmente interessante em dependência química e em transtornos de humor. Berk et al. (2007a; 2007b) propôs um modelo de estadiamento clínico para o TB, ressaltando a importância de acrescentar à compreensão do TB a dimensão temporal ao curso da doença, em vez de uma compreensão transversal. Afirmava ainda que o estadiamento seria útil para planejar tratamento e para avaliar prognóstico. Os estadiamentos propostos não contemplavam, no entanto, o uso de biomarcadores, atualmente estabelecido por Kapczinski et al. (2007a; 2009b).

Abaixo, tabela 1 sintetiza o modelo de estadiamento e suas características em cada estágio (Kapczinski et al., 2009a).

Tabela 1 – “Clinical Staging in Bipolar Disorder” Fonte: “Clinical Implications of a staging model for bipolar disorder” (Kapczinski et al., 2009a).

Table 1. Clinical staging in bipolar disorder.					
Stage	Clinical features	Biomarkers	Cognition	Maintenance treatment	Prognosis
Latent	At risk for developing BD, positive family history, mood or anxiety symptoms without criteria for threshold BD	Polymorphisms that confer susceptibility to BD	No impairment	↓ Exposure to pathogens	Good prognosis when protected from pathogens
I	Well-defined periods of euthymia without overt psychiatric symptoms	↑ TNF- α ↑ 3-nitrotyrosine	No impairment	Mood stabilizer monotherapy; psychoeducation	Good prognosis with careful prophylaxis
II	Symptoms in interepisodic periods related to comorbidities	↑ TNF- α ↓ BDNF ↑ 3-nitrotyrosine	Transient impairment	Combined treatment (pharmacotherapy + psychotherapy; focus on the treatment of comorbidities)	Prognosis depends on how well comorbidities can be managed. Worse than stage I
III	Marked impairment in cognition and functioning	Morphometric changes in brain may be present ↑ TNF- α ↓ BDNF ↑ 3-nitrotyrosine	Severe cognitive impairment associated with functioning impairment (unable to work or very impaired performance)	Complex regimens usually required; consider innovative strategies	Reserved prognosis; rescue therapy required
IV	Unable to live autonomously owing to cognitive and functional impairment	Ventricular enlargement and/or white matter hyperintensities ↑ TNF- α ↓ BDNF ↑ Glutathione reductase and transferase ↑ 3-nitrotyrosine	Cognitive impairment prevents patients from living independently	Palliative; daycare center	Poor prognosis

BD: Bipolar disorder; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor.

2.2 Familiares de Primeiro Grau de Pacientes com Transtorno Bipolar - Risco, Biomarcadores, Cognição e Funcionalidade

A fisiopatologia do TB não é completamente compreendida, mas evidências apontam para a contribuição genética, em conjunto com outros fatores (Craddock & Sklar, 2013). Os pacientes com TB que relatam história familiar de TB parecem apresentar sintomas mais proeminentes do que aqueles sem história na família, dados apontam que apresentam perfil clínico mais grave quando buscam tratamento e pior curso da doença (Antypa & Serretti, 2014). O Estudo BRIDGE (Angust et al., 2011) ressalta a relevância da associação entre história familiar e diagnóstico de TB em pacientes com depressão. O risco de TB intrafamiliar diminui ao

passo que a relação de parentesco fica mais distante (Craddock & Sklar, 2013). Como mencionado anteriormente, a prevalência do TB na população geral é de 0,5 a 1,5%, o risco em irmão de pacientes é de cerca de 10%, e o risco de gêmeos monozigóticos varia entre 40 a 70% (Craddock & Jones, 1999). Nesse sentido, estudar familiares de primeiro grau de pacientes com diagnóstico de TB é uma oportunidade para buscar melhor compreensão de fatores genéticos compartilhados que podem estar associados à fisiopatologia da doença. Além disso, é uma forma de conhecer melhor tal população e suas vulnerabilidades.

Dados da literatura mostram que, mesmo antes de desenvolver TB, filhos de pacientes com TB apresentaram maior prevalência de psicopatologia quando comparados a filhos de pais saudáveis. Hirshfeld-Becker et al. (2006) examinou filhos de pacientes com BD, filhos de pacientes com pânico ou depressão maior, e filhos de pais saudáveis. Encontrou resultados cujos índices apontavam que filhos de pacientes com TB apresentavam maior frequência de transtornos de conduta e transtornos de ansiedade, sugerindo que psicopatologias podem ser já evidentes na primeira infância (Hirshfeld-Becker et al., 2006).

Ademais, foi comprovado que indivíduos com risco genético apresentam alguns traços de alterações neurobiológicas. Fusar-Poli et al. (2012) realizou revisão sistemática sobre estudos com neuroimagem em indivíduos com risco genético para TB (gêmeos, irmãos, filhos, parentes de primeiro e segundo graus) e encontrou alterações significativas estruturais e funcionais. Estudos de neuroimagem que avaliam impacto a estímulos emocionais também apontam para alterações nos irmãos de pacientes com TB, mostrando redução de ativação do córtex frontal medial de pacientes, enquanto, em seus irmãos, há aumento desse indicador, dando margem para especular um possível efeito compensatório no grupo de irmãos (Krüger et al., 2006).

Além disso, embora os achados ainda sejam controversos, pesquisadores também encontraram alterações cognitivas em familiares de primeiro grau, principalmente em funções executivas e memória verbal, situando as alterações cognitivas como potenciais endofenótipos. Kulkarni et al. (2010) e Nehra et al. (2014) encontraram alterações em memória verbal em irmãos de pacientes com TB comparado com controles saudáveis, enquanto Civil Arslan et al. (2014) e Clark et al. (2005) não encontraram alterações em memória verbal em familiares de primeiro grau. Enquanto isso, Arts et al. (2008) realizou metanálise e mostrou que em familiares de primeiro grau de pacientes com TB há alterações em funções executivas e memória verbal, mas com pequeno tamanho de efeito.

Em relação à funcionalidade psicossocial, Linnen et al. (2009), Ellenbogen et al. (2013) e Ostiguy et al. (2012) investigaram o domínio de relacionamento interpessoal em filhos de bipolares e encontraram maior frequência de dificuldade de relacionamento. Bella et al. (2011) realizou estudo no qual avaliou outros domínios além de relacionamento interpessoal e também encontrou prejuízo nos filhos dos pacientes com TB; não foi possível, porém, encontrar estudos que avaliassem funcionalidade psicossocial em irmãos saudáveis de pacientes com TB.

Marcadores de estresse crônico também parecem mostrar alguma alteração nessa população. Filhos de pacientes com TB mostraram aumento de secreção de cortisol durante o dia, sugerindo alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que talvez possam estar associadas ao aumento de vulnerabilidade a transtornos de humor (Ellenbogen et al., 2010). Mais recentemente, Fries et al. (2014) mostrou que a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em irmãos de pacientes com TB apresenta-se com valores intermediários entre pacientes com TB e controles saudáveis, provavelmente devido à reatividade dos receptores de glicocorticóides.

Em relação aos biomarcadores que avaliam inflamação, estresse oxidativo e às neurotrofinas, extensamente pesquisados no TB, não foi possível encontrar na literatura estudos com irmãos saudáveis de pacientes com TB, que tenham avaliado esses parâmetros. Há, entretanto, três diferentes estudos que avaliaram os filhos de pacientes com TB. Ferensztajn et al. (2014) avaliou biomarcadores e o temperamento da prole de pacientes com diagnóstico de TB e comparou os filhos entre si, dividindo-os de acordo com a resposta do paciente ao lítio (filhos de pacientes excelentes respondedores x respondedores intermediários x não respondedores). Encontrou filhos de excelentes respondedores que mostraram perfis de temperamento e neurobiológico diferentes. Park et al. (2015) pesquisou o polimorfismo Val66Met do gene do BDNF em filhos de pacientes bipolares em comparação com controles saudáveis, e encontrou que filhos de pacientes com TB com o genótipo val/Val mostraram maiores níveis de sintomas ansiosos. Mesman et al. (2015) realizou estudo prospectivo de dez anos com filhos de pacientes com TB, cujos resultados sugerem estado neuroimune aberrante na prole de pacientes com TB, persistente muitas vezes na idade adulta e estava presente independentemente do tempo de vida ou de transtornos de humor futuros.

2.3 Conceitos de Endofenótipos

Endofenótipos consistem em biomarcadores que se relacionam com uma doença, pelo menos em parte, sob influências genéticas compartilhadas (Glahn et al., 2014). Trata-se de fatores de risco hereditários que estão presentes tanto em indivíduos afetados quanto em indivíduos não afetados e que, por vezes, apresentam melhor potencial para identificar genes responsáveis pela doença do que o diagnóstico por si só (Almasy & Blangero, 2001; Blangero, 2004; Gottesman & Gould, 2003). O termo foi definido por outros autores como uma

característica mensurável que não é observada a olho nu e que se aproxima mais da genética do que de característica do fenótipo clínico (Gottesman & Gould, 2003).

Em psiquiatria, a busca por endofenótipos e o seu uso para compreender melhor a arquitetura genética das doenças mentais ainda é pouco frequente. Em outras áreas da medicina, observa-se, contudo, que pesquisas vêm apresentando resultados animadores, principalmente em doenças complexas como doenças cardiovasculares, diabetes melitus e osteoporose (Glahn et al., 2014; Glahn et al., 2012; Kathiressan, 2009; Sing, 2003; Comuzzie et al., 1997). Critérios para identificação de endofenótipos em psiquiatria foram propostos por Gershon e adaptados por Gottesman (Gottesman & Gould, 2003; Gershon & Goldin, 1986), conforme figura abaixo:

1. The endophenotype is associated with illness in the population.
 2. The endophenotype is heritable.
 3. The endophenotype is primarily state-independent (manifests in an individual whether or not illness is active).
 4. Within families, endophenotype and illness co-segregate.
- Subsequently, an additional criterion that may be useful for identifying endophenotypes of diseases that display complex inheritance patterns was suggested (29):
5. The endophenotype found in affected family members is found in nonaffected family members at a higher rate than in the general population.

Figura 1: Critérios para identificação de endofenótipos em psiquiatria. Fonte: “The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions” (Gottesman & Gould, 2003).

Endofenótipos podem ser bioquímicos, neurofisiológicos, neuroanatômicos, endócrinológicos, cognitivos ou neuropsicológicos (Gottesman & Gould, 2003). Dentre os

estudos com endofenótipos, as variáveis mais pesquisadas são neuroimagem, estudos eletrofisiológicos e cognição. Entretanto, segundo Glahn et al. (2014), essas características tendem a ter arquiteturas genéticas complexas que poderiam limitar a sua utilidade para a descoberta e caracterização do gene (Glahn et al., 2014), pois não necessariamente sua arquitetura genética é menos complexa do que a da doença associada a essa característica. O autor sugere ainda que uma possível saída para esse impasse seria tentar realizar pesquisas de endofenótipos em doença mental que se aproximasse mais da ação do gene, como pesquisas com proteômicas e transcriptômicas (Glahn et al., 2014).

Além da busca por endofenótipos, existem também tentativas de criar algoritmos preditores de risco para desenvolver TB, os quais seriam essenciais no auxílio de pesquisas que visam a prevenção primária. Um dos modelos propostos (Brietzke et al., 2012) sugere três pilares, considerando que o TB é uma doença multifatorial: 1) Alto risco genético (referindo-se a familiares de primeiro grau de pacientes com TB); 2) Alto risco ambiental (referindo-se a indivíduos com história de trauma na infância); 3) Perfil de biomarcadores de alto risco (referindo-se a marcadores de estresse oxidativo, inflamação e neurotrofinas). Embora, nesse mesmo artigo, o item '3' estivesse amparado pela relevância desses biomarcadores na ftopatologia de pacientes com TB, não havia, no entanto, registro na literatura de resultados desses biomarcadores em familiares de primeiro grau. Até o momento, registros de resultados desses biomarcadores em familiares de primeiro grau são escassos, conforme previamente mencionado.

3 – Justificativa e Objetivos

3.1 Justificativa

Ainda que o TB tenha alta herdabilidade, há relativa escassez de estudos avaliando familiares de primeiro grau. Este tipo de estudo tem o potencial de contribuir para compreensão de endofenótipos, de pródromos e de biomarcadores; e conseqüentemente ampliar o entendimento da fisiopatologia do TB. Alguns estudos demonstraram alterações clínicas e cognitivas nos familiares de pacientes com TB, mas até o momento nenhum estudo avaliou o perfil de biomarcadores (de neuroplasticidade, de inflamação e de envelhecimento precoce) em irmãos de pacientes com TB.

3.2 Objetivo Geral

Estudar o impacto da condição genética/ambiental compartilhada por irmãos não afetados de pacientes com TB na cognição, funcionalidade, e neurobiologia.

3.2 - Objetivos Específicos

- Investigar o impacto da relação familiar de primeiro grau na cognição, dando especial enfoque para funções executivas, memória verbal e funcionalidade psicossocial em irmãos não afetados de pacientes com TB, comparando-os com pacientes com TB e com controles saudáveis.

- Comparar os níveis plasmáticos de BDNF; marcadores inflamatórios interleucina-10 (IL-10), IL-6, CCL11 e CCL24; e marcadores de estresse oxidativo glutathiona S-transferase (GST), 3-nitrotirosina (3-NT), glutathiona redutase (GR) e GPx entre pacientes com TB, irmãos não afetados e controles saudáveis.

- Avaliar o encurtamento de telômeros, como medida de envelhecimento precoce, em pacientes com TB, em irmãos não afetados e em controles saudáveis.

4 - Artigos

4.1 Artigo 1:

Cognitive performance and psychosocial functioning in patients with bipolar disorder, unaffected siblings, and healthy controls

Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno¹², Joana Bücken¹², Kelen Patrícia Bürke¹², Leticia Czepielewski¹², Barbara Tietböhl Martins Quadros Santos¹, Adam Fijtman¹, Ives Cavalcante Passos¹², Mauricio Kunz¹², Caterina del Mar Bonnín³, Eduard Vieta³, Flavio Kapczinski¹², Adriane Ribeiro Rosa¹², Marcia Kauer-Sant'Anna¹².

¹ Bipolar Disorder Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Graduate Program in Medical Sciences: Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³ Bipolar Disorders Program, Institute of Neurosciences, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERSAM, Barcelona, Catalonia, Spain.

Corresponding Author: Mirela Paiva Vasconcelos Moreno, Rua Ramiro Barcellos, 2350, Bairro Santa Cecília, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 (51) 3359.8845, Fax: +55 (51) 3359.8001. E-mail: mpvasconcelosmoreno@gmail.com

Abstract:

Objectives: The objective of this study was to assess cognitive performance and psychosocial functioning in patients with BD, in unaffected siblings, and in healthy controls.

Methods: Subjects were patients with BD (n=36), unaffected siblings (n=35), and healthy controls (n=44). Psychosocial functioning was assessed using the Functioning Assessment Short Test (FAST). A subgroup of patients with BD (n=21), unaffected siblings (n=14) and healthy controls (n=22) also underwent a battery of neuropsychological tests: California Verbal Learning Test (CVLT), Stroop Test and Wisconsin Card Sorting Test (WCST). For clinical and sociodemographic characteristics analysis was used (ANOVA) or the chi-square test; (MANCOVA) was performed to examine differences in neuropsychological variables.

Results: Patients with BD showed higher FAST total scores (23.90 ± 11.35) than healthy controls (5.86 ± 5.47 ; $p < .001$) and siblings (12.60 ± 11.83 ; $p < .001$). Siblings and healthy controls also showed statistically significant differences in FAST total scores ($p = .008$). Patients performed worse than healthy controls on all CVLT subtests ($p < .03$) and in the number of correctly completed categories on WCST ($p = .03$). Siblings did not differ from healthy controls in cognitive tests.

Conclusions: Unaffected siblings of patients with BD may show poorer functional performance compared to healthy controls. FAST scores may contribute to the development of markers of vulnerability in at-risk populations and of endophenotypic traits.

Keywords: Bipolar Disorder; Siblings; Functional Impairment; Cognition; Endophenotype.

Introduction:

The high heritability of bipolar disorder (BD) has been demonstrated in several twin and adoption studies [1]. The risk of first-degree relatives developing BD is approximately 10-fold higher than that of the general population [2]. Despite the evidence supporting the existence of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD, most individuals with a family history of BD will not develop the disorder [2]. Conversely, they may present subtle symptoms or vulnerabilities, which are less studied.

BD is associated with psychosocial functioning decline, and greater impairment is commonly observed at later stages of the illness [3]. Functional disabilities in BD are not limited to symptomatic periods; they may remain present or result in sustained disability [4]. In a follow-up study, after 2 years, 98% of first-episode manic patients had symptomatic recovery, whereas only 38% had functional recovery [5]. Therefore, the inability of patients with BD to function socially and occupationally, and to live independently, are not necessarily associated with symptom status [5].

Neurocognitive deficits have been consistently correlated with functional impairment in BD, pointed as one of the most relevant predictors of functionality in BD [6][7][8]. Patients with low functioning showed poorer cognitive performance, in particular on verbal memory and executive function, even when euthymic [6][7][9][10][11]. Forcada et al. (2011) emphasized that IQ, total white matter volume and depressive illness course were independently associated with functional outcome (with GAF scale), but not in relatives (siblings and offspring). Studies with first-episode manic patients have consistently shown deficits in visual, verbal, and working memory when compared to healthy controls [12][13].

Some studies have suggested the presence of cognitive dysfunction in unaffected first-degree relatives of patients with BD when compared to healthy controls, particularly in executive function and/or verbal memory [14][15][16]. Arts et al. (2008), in a meta-analysis, showed a small effect size ($d < .5$) for executive function and verbal memory parameters in first-degree relatives.

Moreover, there is evidence supporting the existence of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD [17]. A systematic review of neuroimaging studies involving individuals at high genetic risk for BD (twins, siblings, offspring, first-degree and second-degree relatives of patients) found accumulating structural and functional imaging evidence suggesting abnormalities in this population [17].

Even though BD has a strong genetic underpinning, little is known about clinical or biological features associated with risk for the illness. In this sense, a better understanding of familial risk for BD in siblings and of how this familial risk is clinically manifested could help researchers identify heritable subphenotypes of the disorder, as this population has high genetic loading for BD because of the shared DNA. It may shed light on the pathophysiology of the condition, and possibly encourage further research into the genetic architecture of BD.

Therefore, the objective of this study was to investigate the presence of neurocognitive and functioning impairment in patients with BD, in unaffected siblings, and in healthy controls, comparing siblings to the two other, in an attempt to characterize neuropsychological performance and psychosocial functioning in a Brazilian population at genetic risk of developing BD. Considering that cognitive deficits are one of the most relevant predictors of functioning in BD, it would be interesting to assess cognitive performance and functioning in unaffected siblings. We hypothesized that patients with BD and unaffected siblings would show impaired

performance on cognitive and psychosocial functioning tests when compared with healthy controls.

Methods:

Participants:

This is a cross-sectional study reporting data obtained at the Bipolar Disorder Program, at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, southern Brazil. Participants included outpatients receiving a diagnosis of BD type I at the program, one or more unaffected siblings of each patient included, and healthy controls. Thirty-six patients with BD, 39 unaffected siblings, and 44 healthy subjects were included. All patients were tested for mood symptoms and psychosocial functioning; a subgroup of 21 patients, 14 siblings, and 22 healthy controls underwent a battery of neuropsychological tests. Inclusion criteria for patients were: having a diagnosis of BD type I according to the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I), being on current pharmacological treatment, being euthymic for at least 45 days, presenting scores ≤ 7 on the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) and the Young Mania Rating Scale (YMRS), not having neurological diseases or severe clinical illnesses, having siblings without a diagnosis of BD, agreeing to participate in the study.

Siblings were included if they did not have a psychiatric diagnosis according to DSM-IV, if they scored ≤ 7 on HDRS and YMRS, did not have neurological diseases or severe clinical illnesses, and if they agreed to participate in the study.

Finally, controls were volunteer blood donors invited and recruited at the Blood Bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Inclusion criteria for the control group were: not having a psychiatric diagnosis according to DSM-IV, scoring ≤ 7 on HDRS and YMRS, not having

neurological diseases or severe clinical illnesses, having a negative psychiatric history, having a negative family history of psychiatric disorders (considering all first degree-relatives), agreeing to participate in the study. Individuals with unstable inflammatory diseases were excluded. All controls underwent a comprehensive clinical interview conducted by a well-trained psychiatrist, using a short version of the SCID-I.

All the procedures described in this study were approved by the local research ethics committees. Written informed consent was obtained from all the participants prior to any study procedures.

Assessment:

Depressive and manic symptoms were assessed using HDRS and YMRS, respectively. Cognitive performance was assessed with a focus on executive function and verbal memory, areas that have been demonstrated to be relevant in BD [18]. Executive function was evaluated using the Stroop Color Reading Interference Test [19] and the standard score of the Wisconsin Card Sorting Test (WCST) [20]. Verbal memory was measured using the California Verbal Learning Test (CVLT) [21].

Psychosocial functioning was assessed using the Functioning Assessment Short Test (FAST), a 4-point Likert-type scale containing 24 items whose scores may range from 0 to 72; higher scores indicate poorer functional status [22]. The scale covers six specific areas of psychosocial functioning: autonomy, occupational functioning, cognitive functioning, financial issues, interpersonal relationships, and leisure time. The FAST has been validated for use both in the Brazilian population [23] and in patients with BD [22], and has been reported to be sensitive to change [24][25].

Statistics:

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows, version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). The three groups (patients, siblings, and healthy controls) were compared with regard to clinical and sociodemographic characteristics using either analysis of variance (ANOVA) or the chi-square test, as appropriate. Multivariate analysis of covariance (MANCOVA) was performed to examine differences in neuropsychological variables between groups. Cognitive variables were used as dependent variables, mood symptoms (HDRS and YMRS results) as covariates, and the group was the main factor. Comparisons showing significant effects were further analyzed using MANCOVA followed by Tukey's HSD post-hoc tests.

Pearson's correlation was used to evaluate the relationship between functioning, cognitive variables, and clinical variables in the group of patients with BD. A linear regression model was used to identify the best predictors of psychosocial functioning; all clinical variables showing correlation with FAST scores were tested. All analyses were two-tailed. Significance was set at $p < .05$.

Results:

Thirty-six patients with BD, 39 unaffected siblings, and 44 healthy subjects were included in the study. Sociodemographic variables and mood rating scale scores are shown in Table 1. Variables, including gender, age and years of education were not significantly different between patients, siblings and control groups.

Patients, siblings, and healthy controls all showed very low subthreshold symptoms, as indicated by mood rating scale scores. However, there were statistical differences in depressive and manic symptom scores between patients and healthy controls ($p < .01$) and between siblings and healthy controls ($p < .01$). As expected, patients with BD showed higher FAST total scores (23.91 ± 11.35) when compared to both healthy controls (5.86 ± 5.48 ; $p < .001$) and siblings (12.60 ± 11.83 ; $p < .001$). Siblings and healthy controls also showed statistical differences in FAST total scores ($p = .008$, Figure 1).

Patients also showed higher functional impairment than healthy controls when FAST domains were analyzed separately (all $p < .004$). When compared with siblings, patients showed higher functional impairment in the autonomy ($p \leq .001$), occupational ($p \leq .001$), cognition ($p = .004$), financial ($p = .03$), and interpersonal relationships ($p = .01$) domains. There were also statistical differences between siblings and healthy controls, with siblings showing higher impairment in cognition ($p = .01$), interpersonal relationships ($p = .003$), and leisure time ($p = .04$). FAST scores obtained for all three groups are shown in Table 2.

Because the groups differed in terms of HDRS scores, MANCOVA was used to control for potential confounders, using the group as the main factor. The analysis revealed significant differences in functioning between the groups, even when HDRS was used as a covariate (Pillai's $F = 3.620$, $df = 2$, $p \leq .001$).

Neuropsychological results are shown in Table 3. MANCOVA (Pillai's $F = 1.481$, $df = 2$, $p < .001$) was performed for the main effect and revealed significant differences in cognitive performance between the groups. Patients performed worse than both healthy controls and siblings on all CVLT subtests (all $p < .01$). Executive function showed significant differences between patients and healthy controls in the number of correctly completed categories on WCST

($p=.03$). The same pattern was found when HDRS and YMRS scores were used as covariates in MANCOVA. Medications currently in use by the patients who performed neuropsychological tests are shown in Table 1.

Correlations were found between CVLT long delayed free recall and HDRS ($r=-.44$, $p=.02$), and between CVLT total recall and HDRS ($r=-.51$, $p\leq.01$). There were also significant positive correlations between FAST total scores and HDRS ($r=.65$, $p<.001$), number of previous depressive episodes ($r=.55$, $p=.002$), number of previous manic episodes ($r=.63$, $p<.001$), and number of previous hospitalizations ($r=.38$, $p=.03$).

Finally, in the linear regression model, HDRS scores, number of depressive episodes, number of psychiatric hospitalizations, and number of manic episodes were entered simultaneously as predictors into a regression equation using FAST total scores as the dependent measure. Only HDRS scores remained a significant predictor of FAST total scores ($B=1.81$, $SE=.57$, $p=.004$).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with bipolar disorder, unaffected siblings, and healthy controls.

Characteristics	Patients (n=36)	Siblings (n=39)	Controls (n=44)	P-Value
	Mean(SD)	Mean(SD)	Mean(SD)	
Years of education*	10.28(3.93)	10.54(4.77)	12.11(5.23)	.167
Age (years)*	47.25(10.16)	49.76(15.02)	45.84(12.15)	.359
HDRS score*	4.11(2.94)	3.59(3.50)	.70(1.15)	>.001
YMRS score*	.94(1.53)	.10(1.53)	.09(.36)	.001
Sex**	N(%)	N(%)	N(%)	.134
Male	9(25)	12(30,76)	20(45,45)	
Female	27(75)	27(69,23)	24(54,54)	
Illness duration***	19.78(11.54)			
Current medications****	N(%)			
Lithium	14(58.33)			
Valproic acid	12(50.00)			
Typical antipsychotics	2(8.34)			
Atypical antipsychotics	12(50.01)			
Antidepressants	2(8.34)			
Benzodiazepines	3(12.51)			

*Mean and standard deviation, P-Value by ANOVA; **Absolute (N) and frequencies, P-Value by chi-square test; ***Illness duration calculated considering age at diagnosis of bipolar disorder; ****Medications currently in use by patients who completed the neuropsychological battery (n=21). YMRS score, Young Mania Rating Scale; HDRS score, Hamilton Depression Rating Scale.

Table 2: Psychosocial functioning as assessed by specific FAST domains in patients with bipolar disorder, unaffected siblings, and healthy controls. *

	Patients^{ab} (n=33) Mean(SD)	Siblings^c (n=35) Mean(SD)	Controls (n=43) Mean(SD)	F/P-Value
FAST total score	23.91(11.35)	12.60(11.83)	5.86(5.48)	32.01/<.001
FAST autonomy	3.41(2.85)	1.26(2.47)	.63(1.04)	15.80/<.001
FAST occupational	5.38(4.79)	1.69(2.55)	.86(1.39)	21.20/<.001
FAST cognitive	6.47(3.49)	4.11(3.11)	2.14(2.29)	19.83/<.001
FAST financial	1.94(2.09)	.97(1.58)	.53(.85)	7.81/.001
FAST interpersonal relationships	4.69(3.05)	2.86(3.37)	.79(1.47)	19.72/<.001
FAST leisure time	2.03(1.59)	1.71(1.84)	.91(.97)	5.89/.004

*Mean and standard deviation, p value by ANOVA. ^a Patients showed higher functional impairment than healthy controls (all p <.004). ^b Patients showed higher impairment than unaffected siblings in autonomy (p=.001), occupational functioning (p<.001), cognition (p=.004), financial (p=.03), and interpersonal relationships (p=.01). ^c Unaffected siblings showed higher impairment than healthy controls in cognition (p=.01), interpersonal relationships (p=.003), and leisure time (p=.04). FAST, The Functioning Assessment Short Test.

Table 3. Cognitive performance of patients with bipolar disorder, unaffected siblings, and healthy controls

	Patients (n=21)	Siblings (n=14)	Controls (n=22)	ANOVA F/P-Value	Post-hoc
	Mean(SD)	Mean(SD)	Mean(SD)		
CVLT total recall	42.61(10.57)	50.56(8.07)	51.65(10.75)	5.45/.007	P<HC, S ¹
CVLT short delayed free recall 1	8.22(2.96)	10.89(2.11)	11.39(2.65)	9.40/<.001	P<HC, S ²
CVLT long delayed free recall 2	8.78(2.84)	11.11(2.65)	10.11(2.97)	5.63/.006	P<HC,S ³
CVLT short delayed cued recall 1	9.43(2.46)	11.50(1.65)	11.65(2.55)	6.45/.003	P<HC, S ⁴
CVLT long delayed cued recall 2	9.22(2.71)	11.78(2.13)	11.70(2.40)	7.77/.001	P<HC, S ⁵
Stroop interference	107.93(69.13)	82.77(19.05)	79.60(56.81)	1.80/.173	P=HC=S
WCST perseverative errors	83.61(13.93)	80.06(15.14)	88.13(16.30)	1.46/.240	P=S=HC
WCST number of correctly completed categories	2.70(1.29)	2.89(1.53)	3.74(1.35)	3.62/.033	P<HC ⁶

1- $p \leq .01$ between patients and healthy controls; $p = .01$ between patients and unaffected siblings.

2- $p \leq .01$ between patients and unaffected siblings; $p < .01$ between patients and healthy controls.

3- $p \leq .01$ between patients and healthy controls; $p \leq .01$ between patients and unaffected siblings.

4- $p \leq .01$ between patients and unaffected siblings; $p \leq .01$ between patients and healthy controls.

5- $p \leq .01$ between patients and unaffected siblings; $p < .01$ between patients and healthy controls.

6- $p = .03$ between patients and healthy controls.

SD, standard deviation; P, patients; S, siblings; HC, healthy controls; CVLT, California Verbal Learning Test.

Discussion:

To the authors' knowledge, this is the first study to compare cognitive performance and psychosocial functioning between patients with BD, unaffected siblings, and healthy controls. The findings of this research can be summarized as follows: 1) there were significant differences in memory tasks and executive function between patients and healthy controls, but not between siblings and controls; 2) patients showed higher functional impairment according to FAST scores compared to both healthy controls (all domains) and unaffected siblings (some domains); 3) there were statistical differences between siblings and healthy controls in FAST total scores and in specific domains of the scale, namely, cognition, interpersonal relationships, and leisure time.

With regard to patients and healthy controls, our findings are consistent with previous studies that have shown higher cognitive impairment, in particular in executive function and verbal memory, in remitted patients with BD compared to controls [7][10][11], as well as greater functioning impairment in patients vs. healthy controls [3].

However, our study also showed poorer psychosocial functioning in unaffected siblings of patients with BD compared to healthy controls, as measured by the FAST. To our knowledge, this is the first study to evaluate psychosocial functioning in siblings using this instrument. Linnen et al. (2009), Ellenbogen et al. (2013), and Ostiguy et al. (2012) investigated psychosocial functioning in the offspring of patients with BD, but those authors evaluated specifically interpersonal relationships; all three studies found some degree of impairment in the domain assessed. Bella et al. (2011) evaluated other areas in addition to interpersonal relationships in children of patients with BD, and also found impairment. However, we could not find other studies assessing psychosocial functioning in unaffected siblings of patients with BD.

The FAST scores obtained in the present study placed siblings in an intermediate position between patients with BD and healthy controls, suggesting that psychosocial functioning could

be either an endophenotypic trait or a sign of vulnerability and/or resilience in this population. Rosa et al. (2014) found higher FAST scores in late-stage BD patients than in early-stage patients, and suggested that FAST scores could have the potential to distinguish between patients in early versus late stages of BD. We could speculate that the results obtained with siblings in the present study are consistent with the staging model of BD] – siblings might have a so-called latent-stage BD [30], as a result of the biological underpinnings of BD that they share. Conversely, it is also possible that the siblings selected for the present study had a high level of resilience, as they remained without psychiatric diagnosis despite the genetic and environmental factors shared with the patients. Of note, the mean age of siblings in our sample was 45.6 years, which is beyond the first peak age of BD onset (BD type I has two peaks of onset age, the first at 15-24 years and the second at 45-54 years) [31].

Neurocognitive deficits in patients with BD, an established part of the disorder, have been strongly correlated with poor functioning [6][7][8] and with other clinical factors, such as disease severity, chronicity, and residual symptoms [9][32]. Another study has shown that patients with multiple-episode BD have poorer functioning, especially in the FAST domains of autonomy, occupational, interpersonal relationships, and leisure time, compared to first-episode patients [33]. Finally, Forcada et al. (2011) showed that intelligence quotient (IQ), total white matter volume, and a predominantly depressive illness course were independently associated with functional outcomes in patients with BD, but not in their relatives.

In line with the findings described above, the present study found poor cognition and functioning in patients with BD. CVLT parameters in patients were different from those obtained for controls and also for siblings, reinforcing the effect of the disease on cognitive outcomes. This finding highlights the damage caused by number of episodes and number of

hospitalizations, as suggested by Strakowski et al. (2002), who have shown abnormalities in neural circuits involved in mood regulation and cognition in multiple-episode patients. In the present study, CVLT, Stroop Test, and WCST results were similar in siblings and controls.

There are studies reporting significant impairment of verbal working memory in siblings of patients with BD compared to healthy controls [35][36]. Similar results have been found in comparisons between first-degree relatives (siblings, parents) and healthy controls [37][38]. Conversely, other authors have reported negative results for verbal learning, with no differences between first-degree relatives of patients with BD and healthy control groups [39][40]. However, comparison across those studies is limited, as samples are not homogenous with regard to the type and age of first-degree relatives included (siblings, offspring, and parents).

Kulkarni et al. (2010) assessed sample similar to ours, i.e., middle-aged siblings and controls. In that study, unaffected siblings performed poorly on the Tower of London test (TOL) (a planning test) and on Rey's Auditory Verbal Learning Test (RAVLT), but there were no significant differences between siblings and healthy controls on the Stroop Test, the WCST, and the Iowa Gambling Task (IGT). Nehra et al. (2014) also reported poor performance of middle-aged unaffected siblings of patients with BD in verbal learning tests, assessed using the Hopkins Verbal Learning Test-Revised. Again, these controversial findings reported for unaffected relatives may be explained by heterogeneous samples (type and age of relative assessed) and by methodological differences, e.g., in the cognitive tests employed. Moreover, in our study, only a subgroup of participants (smaller sample size) underwent the neurocognitive test battery, reducing the power to detect subtler impairments –which we would expect to be the case with siblings, considering their intermediate position between patients and controls in terms of functional scores. Further studies are warranted to assess cognitive reserve in siblings of patients

with BD, given the apparently relevant role played by this variable in cognitive impairment in BD [32].

Our findings need to be considered in light of two major limitations: first, our small sample size; second, the cross-sectional design of our study. It would be interesting to see the effects of a larger sample and of a longitudinal design on the results here reported.

In conclusion, the present study suggests that unaffected siblings of patients with BD may have poorer functional performance when compared to healthy controls, probably as a result of the genetic background that they share with the patients. The use of FAST scores may contribute to the development of markers in at-risk populations, and may be considered as an endophenotypic trait. It remains to be known whether the impairment of psychosocial functioning found in unaffected siblings has any effect on their quality of life. Further prospective studies are needed to improve our knowledge in this area and help identify endophenotypes.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported by grants from the National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundo de Incentivo à Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

DISCLOSURE:

Dr Kauer-Sant'Anna has received research grants and/or speaking fees from CNPq-INCT-TM, CNPq-Universal, CAPES, SMRI, NARSAD, Eli Lilly, and FIPE-HCPA.

Dr Rosa is grateful for the support provided by L'Oréal Brasil, Academia Brasileira de Ciências, and UNESCO National Commission "For Women in Science."

Dr Kunz has received research grants from CNPq-INCT-TM and CNPq-Universal.

Dr Kapczinski has received grants/research support from AstraZeneca, Eli Lilly, Janssen-Cilag, Servier, CNPq, CAPES, NARSAD, and the Stanley Medical Research Institute; has been a member of the speakers' board for AstraZeneca, Eli Lilly, Janssen, and Servier; and has served as a consultant for Servier.

Dr Vieta has received research grants and served as consultant, advisor, and/or speaker for Almirall, AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, Forest Research, Geodon Richter, GlaxoSmithKline, Janssen-Cilag, Jazz, Lundbeck, Merck, Novartis, Organon, Otsuka, Pfizer, Sanofi-Aventis, Servier, Solvay, Schering-Plough, Takeda, United Biosource, Wyeth, the Spanish Ministry of Science and Innovation, the Stanley Medical Research Institute, and The 7th Framework Program of the European Union.

The other authors report no conflicts of interest.

References:

1 - Antypa N, Serretti A. Family history of a mood disorder indicates a more severe bipolar disorder. *J Affect Disord* 2014; 156: 178-186.

2 - Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51(1): 8-19.

- 3 - Rosa AR, Magalhães PVS, Czepeilewski L, Sulzbach MV, Goi PD, Vieta E, et al. Clinical staging in bipolar disorder: Focus on cognition and functioning. *J Clin Psychiatry* 2014; 75(5): 450-456.
- 4 - Gonzalez-Pinto AM, Dardennes R, de Zélicourt M, López P, Oliveros RG, Vieta E, et al. In-patient care costs of patients with bipolar I disorder: a comparison between two European centers. *J Affect Disord* 2010; 121: 152–155.
- 5 - Tohen M, Hennen J, Zarate CM Jr, Baldessarini RJ, Strakowski SM, Stoll AL, et al. Two-year syndromal and functional recovery in 219 cases of first-episode major affective disorder with psychotic features. *Am J Psychiatry* 2000; 157(2): 220-228.
- 6 - Bonnín CM, Martínez-Aran A, Torrent C, Pacchiarotti I, Rosa AR, Franco C, et al. Clinical and neurocognitive predictors of functional outcome in bipolar euthymic patients: a long-term, follow-up study. *J Affect Disord* 2010; 121: 156–160.
- 7 - Martínez-Aran A, Vieta E, Torrent C, Sánchez-Moreno J, Goikolea JM, Salamero M, et al. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar Disord* 2007; 9: 103–113.
- 8 - Forcada I, Papachristou E, Mur M, Christodoulou M, Jogia J, Reichenberg A, et al. The impact of general intellectual ability and white matter volume on the functional outcome of patients with Bipolar Disorder and their relatives. *J Affect Disord* 2011. 130: 413-420.

9 - Mur M, Portella MJ, Martinez-Aran A, Pifarre J, Vieta E. Influence of clinical and neuropsychological variables on the psychosocial and occupational outcome of remitted bipolar patients. *Psychopathology* 2009; 42: 148–156.

10 - Torres IJ, Boudreau VG, Yatham LN. Neuropsychological functioning in euthymic bipolar disorder: a meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand* 2007; 434: 17-26

11 - Mackala SA, Torres IJ, Kozicky J, Michalak EE, Yatham LN. Cognitive performance and quality of life early in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord* 2014; 168: 119–124.

12 - Hill SK, Reilly JL, Harris MS, Rosen C, Marvin RW, Deleon O, et al. A comparison of neuropsychological dysfunction in first-episode psychosis patients with unipolar depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Schizophr Res* 2009; 113(2–3): 167–175.

13 - Torres IJ, DeFreitas VG, DeFreitas CM, Kauer-Sant'Anna M, Bond DJ, Honer WG, et al. Neurocognitive functioning in patients with bipolar I disorder recently recovered from a first manic episode. *J Clin Psychiatry* 2010; 71(9): 1234–1242.

14 - Arts B, Jabben N, Krabbendam L, Van Os J. Meta-analyses of cognitive functioning in euthymic bipolar patients and their first-degree relatives. *Psychol Med* 2008; **38(6)**: 771-785.

- 15 - Balanzá-Martínez V, Rubio C, Selva-Vera G, Martínez-Aran A, Sánchez-Moreno J, Salazar-Fraile J, et al. Neurocognitive endophenotypes (endophenocognitypes) from studies of relatives of bipolar disorder subjects: a systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32(8): 1426-1438.
- 16 - Bora E, Yucel M, Pantelis C. Cognitive endophenotypes of bipolar disorder: A meta-analysis of neuropsychological deficits in euthymic patients and their first-degree relatives. *J Affect Disord* 2009; 113: 1–20.
- 17 - Fusar-Poli P, Howes O, Bechdolf A, Borgwardt S. Mapping vulnerability to bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis of neuroimaging studies. *J Psychiatry Neurosci* 2012; 37(3): 170-184.
- 18 - Yatham LN, Torres JJ, Malhi GS, Frangou S, Glahn DC, Bearden CE, et al. The International Society for Bipolar Disorders-Battery for Assessment of Neurocognition (ISBD-BANC). *Bipolar Disord* 2010; 12(4): 351-363.
- 19 - Golden JC. Stroop Color and Word Test. in: Heaton RK, Chelune GJ, Talley JL. *Teste Wisconsin de Classificação de Cartas*. 1978. São Paulo: Casa do Psicólogo. 1981 [Wisconsin Card Sorting Test].
- 20 - Heaton RK, Chelune GJ, Talley JL, Kay GG, Curtiss G. *Wisconsin Card Sort Test Manual: Revised and Expanded 1993*. Odessa, FL: Psychological Assessment Resources.

- 21 - Delis DC, Kramer JH, Kaplan E, Ober BA. California verbal learning test manual: 2nd edition 2000. The Psychological Corporation.
- 22 - Rosa AR, Sanchez-Moreno J, Martínez-Aran A, Salamero M, Torrent C, Reinares M, et al. Validity and reliability of the Functioning Assessment Short Test (FAST) in bipolar disorder. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* 2007; 3: 5.
- 23 - Cacilhas AA, Magalhães PV, Ceresér KM, Walz JC, Weyne F, Rosa AR, et al. Validity of a short disability test (FAST) in Brazilian outpatients with bipolar disorder. *Value Health* 2009; 12: 624–627.
- 24 - Rosa AR, Reinares M, Amann B, Popovic D, Franco C, Comes M, et al. Six-month functional outcome of a bipolar disorder cohort in the context of a specialized-care program. *Bipolar Disord* 2011; 13(7-8): 679-86.
- 25 - Torrent C, Bonnin Cdel M, Martínez-Arán A, Valle J, Amann BL, González-Pinto A, et al. Efficacy of functional remediation in bipolar disorder: a multicenter randomized controlled study. *Am J Psychiatry* 2013; 170(8): 852-859.
- 26 - Linnen AM, Rot M, Ellenbogen MA, Young SN. Interpersonal functioning in adolescent offspring of parents with bipolar disorder. *J Affect Disord* 2009; 114: 122–130.

27 - Ellenbogen MA, Linnen AM, Santo JB, Rot M, Hodgins S, Young SN. Salivary cortisol and interpersonal functioning: An event-contingent recording study in the offspring of parents with bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38: 997-1006.

28 - Ostiguy CS, Ellenbogen MA, Hodgins S. Personality of parents with bipolar disorder and interpersonal functioning among their offspring: A prospective 10-year study. *Dev Psychopathol* 2012; 24: 573–587.

29 - Bella T, Goldstein T, Axelson D, Obreja M, Monk K, Hickey MB, et al. Psychosocial functioning in offspring of parents with bipolar disorder. *J Affect Disord* 2011; 133: 204–211.

30 - Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant’Anna M, Frey BN, Grassi-Oliveira R, Colom F, et al. Clinical implications of a staging model for bipolar disorders. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 957–966.

31 - Kroon JS, Wohlfarth TD, Dieleman J, Sutterland AL, Storoosum JG, Denys D, et al. Incidence rates and risk factors of bipolar disorder in the general population: a population-based cohort study. *Bipolar Disord* 2013; 15(3): 306-313.

32 - Forcada I, Mur M, Mora E, Vieta E, Bartrés-Faz D, Portella MJ. The influence of cognitive reserve on psychosocial and neuropsychological functioning in bipolar disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol* 2015; 25: 214-222.

33 - Rosa AR, González-Ortega I, González-Pinto A, Echeburúa E, Comes M, Martínez-Àran A, et al. One-year psychosocial functioning in patients in the early vs. late stage of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand* 2012; 125: 335–341.

34 - Strakowski SM, Delbello MP, Zimmerman ME, Getz GE, Mills NP, Ret J, et al. Ventricular and periventricular structural volumes in first versus multiple-episode bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 1841–1847.

35 - Kulkarni S, Jain S, Janardhan Reddy YC, Kumar KJ, Kandavel T. Impairment of verbal learning and memory and executive function in unaffected siblings of probands with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2010; 12(6): 647-656.

36 - Nehra R, Grover S, Sharma S, Sharma A, Sarkar S. Neuro-cognitive functioning in unaffected siblings of patients with bipolar disorder: Comparison with bipolar patients and healthy controls. *Indian J Psychiatry* 2014; 56(3): 283-288.

37 - Bora E, Vahip S, Akdeniz F, İlerisoy H, Aldemir E, Alkan M. Executive and verbal working memory dysfunction in first-degree relatives of patients with bipolar disorder. *Psychiatry Research* 2008; 161: 318–324.

38 - Glahn DC, Almasy L, Barguil M, Hare E, Peralta JM, Kent Jr JW, et al. Neurocognitive endophenotypes for bipolar disorder identified in multiplex multigenerational families. *Arch Gen Psychiatry* 2010. 67(2): 168-177.

39 - Civil Arslan F, Tiryaki A, Ozkorumak E. A comparison of euthymic bipolar patients with unaffected first-degree relatives and healthy controls in terms of neuropsychological functions. *Int J Psychiatry Clin Pract* 2014; 18(3): 208-214.

40 - Clark L, Sarna A, Goodwin GM. Impairment of executive function but not memory in first-degree relatives of patients with bipolar I disorder and in euthymic patients with unipolar depression. *Am J Psychiatry* 2005. 162(10): 1980–1982.

4.2 Artigo 2:

Telomere length, oxidative stress, inflammation and BDNF levels in siblings of patients with bipolar disorder: implications for accelerated cellular aging

Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno,^{1,2} Gabriel Rodrigo Fries,^{1,2} Carolina Gubert,^{1,2} Bárbara Tietböhl Martins Quadros dos Santos,¹ Adam Fijtman,¹ Juliana Sartori,^{1,2} Pamela Ferrari,^{1,2} Lucas Kich Grun,³ Mariana Migliorini Parisi,³ Florencia M. Barbé-Tuana,³ Flávio Kapczinski,^{1,2} Adriane R Rosa,^{1,2} Marcia Kauer-Sant'Anna,^{1,2}

¹ Laboratório de Psiquiatria Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas – Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author: Marcia Kauer-Sant'Anna, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Bairro Santa Cecília, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55-51-3359-8845; Fax: +55-51-3359-8846; email: mksantanna@gmail.com

Abbreviations:

3-NT: 3-nitrotyrosine

BMI: body mass index

BD: bipolar disorder

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CCL11: C-C motif chemokine 11

CCL24: C-C motif chemokine 24

CNS: central nervous system

dNTP: deoxynucleotide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

gDNA: genomic DNA

GPx: glutathione peroxidase

GR: glutathione reductase

GST: glutathione S-transferase

HDRS: Hamilton Depression Rating Scale

HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal

IL-10: interleukin 10

IL-6: interleukin 6

MDD: major depression disorder

OD: optical density

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

SCID-I: Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders

T/S ratio: relative telomere length

TL: telomere length

YMRS: Young Mania Rating Scale

Abstract:

Background: Bipolar disorder (BD) is a multifactorial illness associated with changes in neurotrophins, inflammation, and oxidative stress. Also, BD has also been associated with telomere shortening, a biomarker of aging. Growing evidence supports the existence of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD. The aim of this study was to examine potential differences in biological markers between patients with BD, their siblings, and healthy controls.

Methods: Thirty-six patients with BD type I, 39 siblings and 44 healthy controls were assessed. After blood collection, serum levels of brain-derived neurotrophic factor, interleukin (IL)-6, IL-10, C-C motif chemokine (CCL) 11, CCL24, and 3-nitrotyrosine (3-NT) were measured, as were the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and glutathione S-transferase (GST), in all subjects. Telomere length (T/S ratio) was measured using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Biomarkers were analyzed using either one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, or Kruskal-Wallis's followed by Mann-Whitney's test, as appropriate. Telomere length results were analyzed using the Jonckheere-Terpstra test. Bonferroni corrections were applied to control for multiple comparisons.

Results: Telomere length was different between the three groups ($p = 0.041$). Patients showed increased levels of IL-6 ($p = 0.005$) and IL-10 ($p = 0.002$) compared to controls, as well as increased levels of IL-6 ($p = 0.014$) and CCL24 ($p = 0.016$) compared to their siblings. CCL11 levels were increased in siblings compared to controls ($p = 0.015$). GPx activity was decreased in patients compared to both controls ($p = 0.006$) and siblings ($p = 0.025$). No differences were found between the groups for the other markers.

Conclusions: The present results reinforce the hypothesis of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD and suggest that unaffected siblings may present accelerated aging features compared to healthy controls. These neurobiological findings may contribute to the development of markers for population studies and may be considered as endophenotypic traits. Further prospective studies are warranted to confirm these results and to clarify the clinical meaning of these biological abnormalities.

Introduction

Bipolar disorder (BD) is among the most disabling mental illnesses affecting adults: it is associated with high rates of functional impairment even during remission of mood symptoms (Yatham et al., 2005). BD has classically been seen as a cyclic disease, but recent evidence supports progressive features of the condition (Fries et al., 2012; Mansur et al., 2013), reframing BD as both a cyclic and a progressive disorder. Clinical evidence and biomarker studies (Kauer-Sant'Anna, 2009) have shown that individuals at early and late stages of BD present substantial differences in clinical presentation severity and treatment response; this has led to the development of an illness staging model based on clinical symptoms, biomarkers, and neurocognitive performance progression (Kapczinski et al., 2009; Berk et al., 2011). Several biomarkers have been associated with BD, but the neurobiological underpinnings that underlie these associations remain to be discovered.

The deleterious neuropathological processes seen in BD, including its accelerating, progressive course, have led investigators to believe that the pathophysiology of the condition is probably associated with poor metabolic stress compensation (Berk et al., 2011). A growing body of evidence suggests that changes in oxidative stress, inflammatory cytokines, neurotrophins, neurogenesis, mitochondrial energy generation, and stress-related hormones may play a role in BD neuropathology (Berk et al., 2011). In addition, recent studies have suggested that telomeres are shorter in patients with BD compared to controls (Rizzo et al., 2013; Simon et al., 2006; Elvsåshagen et al., 2011; Lima 2015).

Telomeres are structures found at the ends of chromosomes. They consist of protein complexes and non-coding DNA comprising hundreds to thousands of tandem repeats of TTAGGG (de Lange et al., 2005), which are crucial for maintaining chromosomal integrity and

protecting them from loss of genetic material and end-to-end recombination (Blackburn, 2005). Telomere length (TL) is determined by the number of divisions that the cell has undergone, the higher the number of divisions, the shorter the length (Bojesen, 2013); at a certain critical short length, the cell loses the ability to divide and enters senescence (Nitta et al., 2011). Therefore, telomere shortening has been used as a biological marker of aging (Blackburn, 2005).

Short telomeres have been associated with increased risk of early death in the general population, but it is unclear whether the former are the cause or only represent a trait of risk for the latter (Bojesen, 2013). Of note, some studies have suggested that telomere shortening may be associated with aging-related diseases, such as cardiovascular disease and diabetes (Salpea et al., 2010; Wong et al., 2010). Moreover, factors such as age, sex, obesity, smoking, and lifestyle are known to influence TL (Weischer et al., 2012; Fitzpatrick et al., 2011; Njajou et al., 2012; Cassidy et al., 2010; Sun et al., 2012; Hastie et al., 1990). Finally, heritability (i.e., the variation in TL explained by hereditary factors) has been found to vary between 60 and 80% (Njajou et al., 2007; Atzmon et al., 2010).

There is evidence suggesting that high levels of pro-inflammatory cytokines during a depressive episode are associated with telomere shortening (Damjanovic et al., 2007). Simon et al. (2006) reported a reduction in TL in peripheral leukocytes in individuals with major depression disorder (MDD) and BD compared with healthy controls, and other authors have confirmed telomere shortening in BD (Lima et al., 2015; Elvsåshagen et al., 2011; Martinsson et al., 2013). Rizzo et al. (2014) published a review focusing on a theory of BD as an illness of accelerated aging. According to those authors, investigation of aging and senescence processes could contribute to the search for new and promising molecular targets to help explain and ameliorate neuroprogression in BD (Rizzo, 2014).

In line with the aging approach, Villeda et al. (2011) suggested a mechanism whereby systemic toxicity could have direct effects on the central nervous system (CNS); this study showed that C-C motif chemokine 11 (CCL11) could cause deficits in synaptic plasticity, neurogenesis and cognition that are associated with aging. Magalhães et al. (2014), in a population-based sample of young adults, confirmed previous findings (Barbosa et al., 2013; Brietzke et al., 2009) that pointed to a role played by CCL11 in BD-related neuropathological processes.

Siblings of patients with BD may represent a vulnerable group, as BD has a strong component of heritability (Antypa and Serretti, 2014). The risk for BD in first-degree relatives is approximately 10-fold higher than in the general population (Kessler et al., 1994), and patients with BD reporting a family history of mood disorder have been shown to present a worse clinical profile upon presentation for treatment and a more symptomatic course of the disorder (Antypa and Serretti, 2014). Recent evidence has suggested the existence of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk (siblings or offspring), including neuroimaging findings (Fusar-Poli et al., 2012), cognitive parameters (Arts et al., 2008), and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis functioning (Ellenbogen et al., 2010; Fries et al., 2014). Specifically, Fries et al. (2014) showed that HPA axis activity in siblings of patients with BD lies somewhere between that of controls and patients with BD.

Despite the evidence supporting the existence of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD, most individuals with a family history of BD do not develop the disorder (Kessler et al., 1994). Thus, a better understanding of the familial risk for BD in siblings of patients (a population with a high genetic load for BD) could help researchers to identify endophenotypes of the disorder. Assessing how this familial risk is clinically manifested

could provide insights into characterizing subphenotypes of the disorder, shed light on the pathophysiology of the condition, and foster further research into the genetic architecture of BD. In an attempt to advance knowledge in this area, in this paper we investigate the role played by telomere shortening and aging pathways in this pathological process.

In order to characterize the neurobiological profile of a population at genetic risk for BD, the aim of this study was to examine potential differences in biological markers between patients with BD, their unaffected siblings, and healthy. We hypothesized that biomarkers would be altered in patients with BD and in unaffected siblings of BD when compared to control subjects.

Methods

Participants

This is a cross-sectional study presenting data from the Bipolar Disorders Program of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Participants were outpatients of the referred program with a diagnosis of BD type I (n = 36), unaffected siblings of each BD patient included (n = 39), and healthy controls (n = 44).

Inclusion criteria for patients were: BD type I diagnosis according to the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I), current pharmacological treatment, euthymia for at least 45 days, Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) and Young Mania Rating Scale (YMRS) scores ≤ 7 , absence of neurological or severe clinical illnesses, and having siblings without a diagnosis of BD. Siblings were included if they were free from any psychiatric diagnosis according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV), if they scored ≤ 7 on HDRS and YMRS, and if they did not have any neurological or severe clinical illnesses.

Controls were volunteer blood donors from the Blood Bank Program of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, invited and recruited to this research. Inclusion criteria for the control group were: not fulfilling criteria for any psychiatric diagnosis according to DSM-IV (checked with SCID-I), HDRS and YMRS scores ≤ 7 , absence of neurological or severe clinical illnesses, a negative history of psychiatric disorders, and a negative history of psychiatric disorders in first degree-relatives. Individuals with unstable inflammatory diseases were excluded. All controls underwent a comprehensive clinical interview conducted by a well-trained psychiatrist, using a short version of the SCID-I, HDRS and YMRS.

All study procedures were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Written informed consent was obtained from all participants (patients with BD, siblings, and controls) prior to their inclusion in the study.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) analysis

Ten milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture into a vacuum tube without anticoagulant. The blood was centrifuged at 4,000 g for 10 min, and serum was kept frozen at -80°C until assayed. BDNF serum levels were measured with sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, MA, USA). Briefly, 96-well flat-bottom microtiter plates were coated for 24 h at 4°C with the samples diluted 1:100 in sample diluent and a standard curve ranging from 7.8 to 500 pg of BDNF. Plates were then washed four times with buffer followed by the addition of biotinylated mouse anti-human BDNF monoclonal antibody (diluted 1:1000 in sample diluent), which was incubated for 3 h at room temperature. After washing, a second incubation with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate solution (diluted 1:1000) for 1 h at

room temperature was carried out. After the addition of substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set at 450 nm). The standard curve demonstrated a direct relationship between optical density (OD) and BDNF concentration. Intra- and inter-assay variation of the kit was 3.7 and 8.5%, respectively.

Oxidative stress parameters

Oxidative stress parameters included glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), and 3-nitrotyrosine (3-NT). GPx, GR, and GST activities were measured using commercial kits from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), and 3-NT levels were assessed using a commercially available competitive ELISA kit (Millipore, Billerica, MA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Inflammatory markers

IL-6 and IL-10 concentrations were determined by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Enhanced Sensitivity Flex Set (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Sample processing and data analysis were performed using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Samples for the measurement of eotaxin-1/CCL11 and eotaxin-2/CCL24 chemokines were assayed by sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Measurement of relative telomere length (T/S ratio)

Whole peripheral venous blood was used for genomic DNA (gDNA) extraction using a commercial kit (Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Nucleic acid quantification and purity were assessed spectrophotometrically (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany), and samples were stored at -20 °C for subsequent analysis. gDNA (25 ng/reaction) was used as template for the quantification of mean relative telomere length (T/S) using real-time qPCR, with minor modifications to the method previously described (Cawthon et al., 2002). Briefly, for each sample, two separate qPCR assays were performed, in triplicate, in separate 96-well plates, and in the same position. One reaction amplified the telomere (T) repeat sequence, while the other amplified a single copy gene (S), 36B4, which served as quantitative control. For each participant, relative TL was expressed as T/S ratio. Previously published primer sequences (Cawthon et al., 2002) were (5'→3'): tel 1, GGGTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT; tel 2, TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA; 36B4u, CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC; and 36B4d, CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA. T and S master mix reactions were identical in a final volume of 20 µL with 0.1x SYBR® Green (Molecular Probes, CA, USA), 2 mM MgCl₂, 0.1 mM of each deoxynucleotide (dNTP), 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 0.5 U of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Final primer concentrations for telomere amplification were 270 and 1,125nM for telomere primers, respectively; and 300 and 500 nM for 36B4u and 36B4d primers, respectively. PCR reactions were performed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and analyzed using StepOne™ Software v2.3. (Applied Biosystems). The thermal cycling profile used for telomere amplification consisted of an initial incubation step for

10 min at 94 °C to activate hot start Platinum Taq DNA Polymerase, followed by 22 cycles of denaturing at 94 °C for 15 s and annealing and extension for 2 min at 54 °C. For 36B4, amplification consisted of 30 cycles of denaturing at 94 °C for 15 s followed by annealing and extension for 2 min at 60 °C. The specificity of the amplification was confirmed at the end of each run using melting curve analysis. Additionally, PCR products were confirmed using agarose gel electrophoresis. In each run, a reference sample was included as a calibrator to normalize the participant's T/S ratio and calculate the final T/S ratio. Finally, in order to check for PCR amplification efficiency, standard curves for telomere and 36B4 amplification were generated from the reference sample over a 5-fold range by serial dilution from 100 to 0.16 ng of gDNA.

Statistical analysis

Demographic data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) or chi-square tests, as appropriate. All continuous variables were initially tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. T/S ratios obtained in the different groups were compared using the Jonckheere-Terpstra trend test for continuous variables. BDNF levels, as well as GPx and GR activities, showed a normal distribution and were therefore analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. All other biochemical parameters showed a non-normal distribution and were analyzed using Kruskal-Wallis's followed by Mann-Whitney's tests. P values lower than 0.05 were considered significant, except when Bonferroni correction was applied to control for multiple comparisons (in this case, $p < 0.016$ was considered significant).

Results

The three groups were similar with regard to demographic data, e.g., age, gender, body mass index (BMI), smoking status, and years of education (Table 1). Conversely, patients and siblings showed higher HDRS and YMRS scores when compared to controls, even though all of the participants were euthymic at enrollment. Groups also differed in regard to the prevalence of hypothyroidism, diabetes mellitus, and dyslipidemia (Table 1).

Subjects with BD presented shorter telomeres (T/S ratio) when compared to their siblings and controls (patients' mean = 1.007; siblings' mean = 1.017; healthy controls' mean = 1.300, Figure 1). The Jonckheere-Terpstra test revealed a significant negative trend for T/S ratio ($p = 0.041$) between the three groups. Further comparisons revealed that patients had significantly shorter telomeres than healthy controls ($U = 339$, $p = 0.033$), and that siblings also had shorter telomeres than controls ($U = 550$, $p = 0.05$). However, no differences were found between patients and siblings ($U = 292$, $p = 0.837$). Differences in T/S ratios remained significant after adjustment for age ($\beta = -0.141$, $p = 0.171$) and BMI ($\beta = 0.057$, $p = 0.586$) in a multivariate model ($t_{(2,129)}$, $p = 0.036$).

Our results also showed similarities between the groups, namely, for BDNF levels ($F_{(2,105)} = 0.844$, $p = 0.433$; Figure 2), GR activity ($F_{(2,100)} = 0.313$, $p = 0.732$; Figure 3b), GST activity ($\chi^2_{(2)} = 5.182$, $p = 0.072$; Figure 3c), and 3-NT levels ($\chi^2_{(2)} = 0.99$, $p = 0.607$; Figure 3d). GPx activity, in turn, was significantly lower in patients with BD compared to both controls ($F_{(2,101)} = 5.548$, $p = 0.006$; Figure 3a) and siblings ($p = 0.025$), but similar between siblings and controls ($p = 0.864$).

Regarding inflammatory markers, IL-6 levels were significantly higher in patients than in controls ($U = 405$, $p = 0.005$; Figure 4a), but no significant differences were found between patients and siblings ($U = 486$, $p = 0.150$) or between siblings and controls ($U = 609$, $p = 0.092$).

Also, patients presented significantly higher levels of IL-10 when compared to controls ($U = 270$, $p = 0.002$; Figure 4b), whereas no differences were found between patients and siblings ($U = 334.5$, $p = 0.180$) or between siblings and controls ($U = 493.5$, $p = 0.397$). CCL11 levels were significantly increased in siblings compared to controls ($U = 458.5$, $p = 0.015$; Figure 4c), and a similar tendency was found in the comparison between patients and controls ($U = 367$, $p = 0.045$). Of note, patients and siblings showed similar CCL11 levels ($U = 506.5$, $p = 0.879$). Finally, CCL24 levels were increased in patients compared to siblings ($U = 339$, $p = 0.016$; Figure 4d), whereas no differences were found for the other comparisons (patients vs. controls, $U = 404$, $p = 0.087$; siblings vs. controls, $U = 588.5$, $p = 0.392$).

Table 1. Characteristics of controls, siblings, and patients with bipolar disorder

Characteristic	Controls (n = 44)	Siblings (n = 39)	Patients (n = 36)	P
Age (years) ^{a,d}	45.8 (12.1)	49.7 (14.4)	47.2 (10.1)	0.359
Gender (male/female) ^c	20/24	12/27	9/27	0.134
HDRS ^{a,d}	0.7 (1.15)	3.59 (3.5)	4.11 (2.9)	< 0.001
YMRS ^{a,d}	0.09 (0.36)	1.1 (1.5)	0.94 (1.53)	0.001
Body mass index ^{a,d}	27.6 (4.8)	26.6 (5.09)	29.22 (5.5)	0.124
Smoking ^c	11.36%	21.6%	27.7%	0.173
Years of education ^{a,d}	12.1 (5.2)	10.5 (4.7)	10.2 (3.9)	0.167
Age at illness onset ^a			27.47 (10.5)	
Length of illness (years) ^a			19.7 (11.54)	
Number of manic episodes ^a			5.06 (4.85)	
Number of depressive episodes ^a			7.6 (7.8)	
Number of hospitalizations ^a			4.89 (7.8)	
Comorbidities, %				
Hypothyroidism ^c	2.27	16.2	33.3	0.001
Hypertension ^c	18.1	21.6	33.3	0.265
Diabetes mellitus ^c	2.27	0	16.6	0.005
Dyslipidemia ^c	4.5	27.02	19.44	0.02
Obesity ^c	0	0	2.7	0.313
Other ^c	22.7	45.9	27.7	0.107
Psychiatric medication, n (%)				
Lithium			19 (52.78)	
Valproic acid			14 (38.89)	
Typical antipsychotic			6(16.67)	
Atypical antipsychotic			15 (41.66)	
Antidepressants			3 (8.33)	
Benzodiazepines			6 (16.67)	

^aMean (standard deviation); ^bmedian (interquartile range); ^cchi-square test; ^done-way ANOVA. HDRS = Hamilton Depression Rating Scale; YMRS = Young Mania Rating Scale.

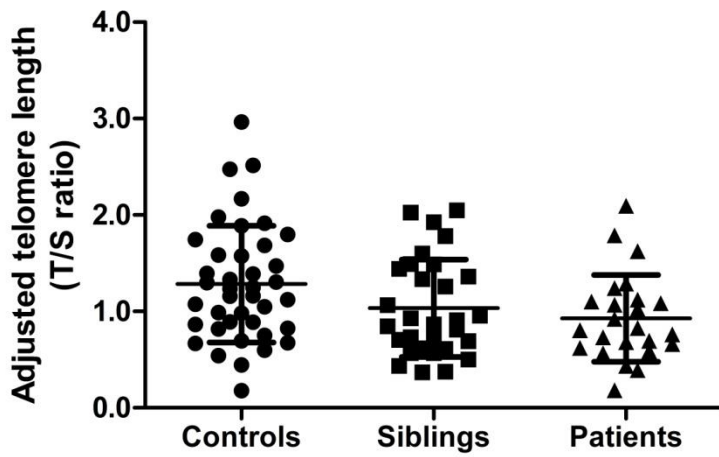


Figure 1. Telomere length in controls, siblings and patients with bipolar disorder .

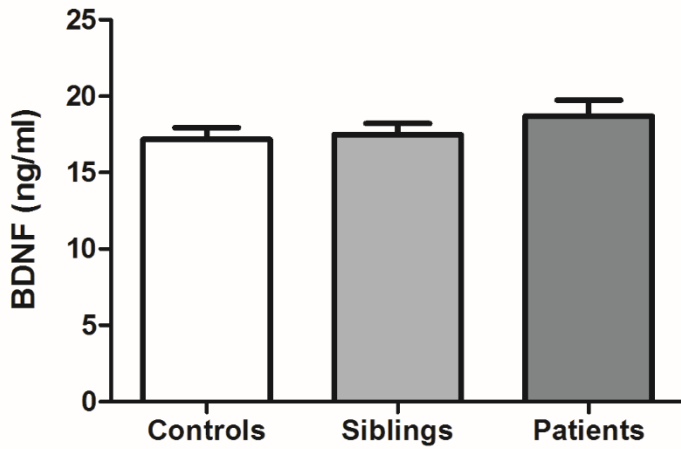


Figure 2. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with bipolar disorder, siblings, and controls.

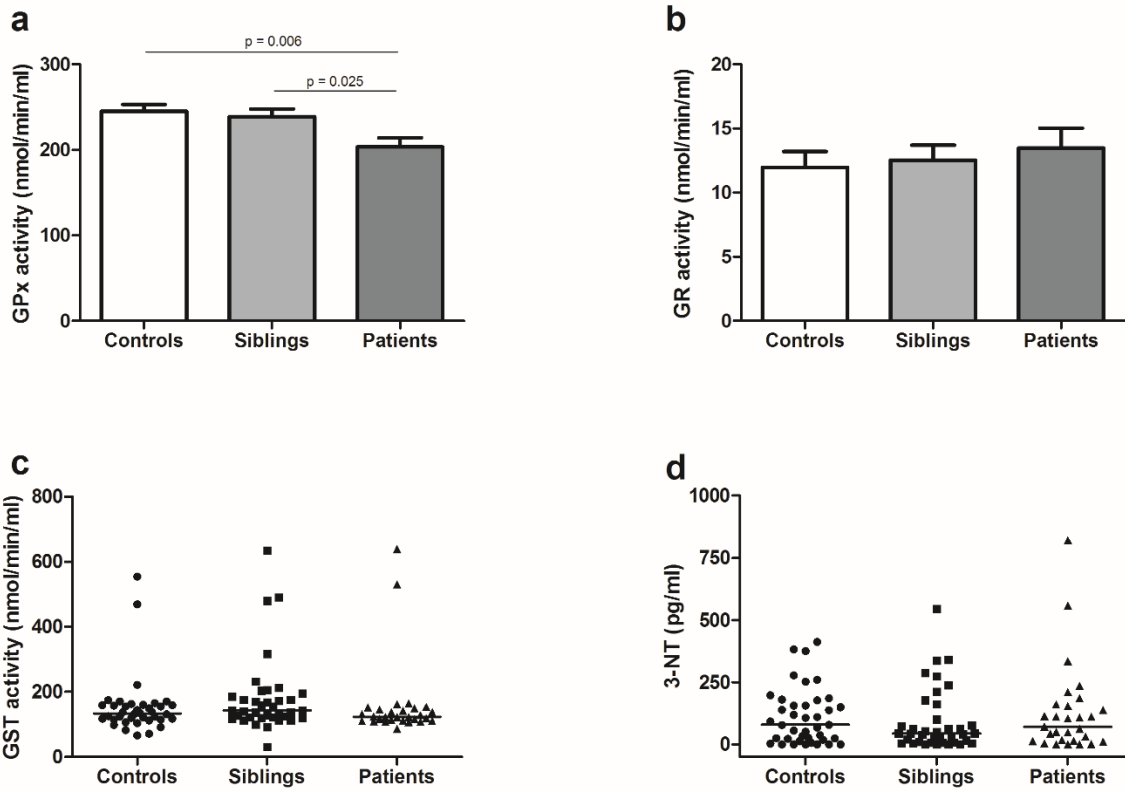


Figure 3. Oxidative stress parameters in patients with bipolar disorder, siblings, and controls.

GPx = glutathione peroxidase; GST = glutathione S-transferase; GR = glutathione reductase; 3-NT = 3-nitrotyrosine.

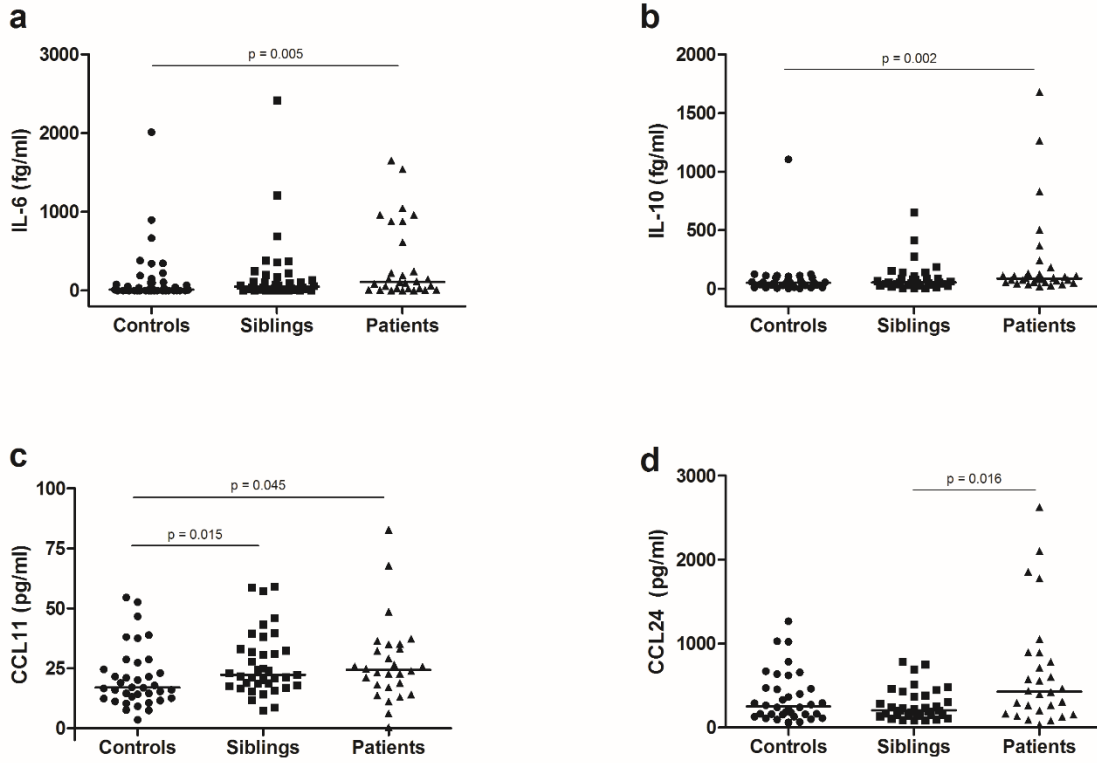


Figure 4. Inflammatory markers in patients with bipolar disorder, siblings, and controls. IL = interleukin; CCL11 = C-C motif chemokine 11; CCL24 = C-C motif chemokine 24.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to show a significant negative trend in telomere shortening in patients with BD, siblings and healthy controls. We found evidence to sustain the hypothesis of progressive development of a senescent phenotype supported by a pro-oxidative and pro-inflammatory milieu that may contribute to the maintenance of the aging phenotype in patients with BD.

The findings of this research can be summarized as follows: 1) TL was reduced in patients compared to healthy controls, but did not differ between patients and siblings; in addition, siblings showed a tendency to be different from healthy controls; 2) CCL11, also an aging marker, was significantly increased in siblings compared to controls, and a similar tendency was also found between patients and controls; 3) IL-6 and IL-10 levels were significantly higher in patients than in controls, but no significant differences were found between patients and siblings; 4) GPx activity was significantly reduced in patients when compared to controls, whereas there were no differences in GR and GST activities or in 3-NT levels between the groups; and 5) BDNF did not differ between the groups.

This study reinforces that aging is probably associated with the neuropathological processes seen in BD, and shows that unaffected siblings may present senescence features, which is an original finding. This new finding is supported by the fact that 60 to 80% of TL is determined by heritability (Njajou et al., 2007; Atzmon et al., 2010), as patients and siblings share genetic background. Moreover, the results found in our patients are in line with previous studies suggesting that telomeres play a role in the neurobiological underpinnings of BD (Simon et al., 2006; Lima et al., 2015; Elvsåshagen et al., 2011). In BD type II, an increased load of short telomeres has been associated with lifetime number of depressive episodes, but not with illness

duration (Elvsåshagen et al., 2011). Association of telomere shortening with depressive episodes, but not with illness duration, has also been observed in MDD (Hartmann et al., 2010; Wolkowitz et al., 2011).

Previous studies have linked certain BD biological markers to aging. Yatham et al. (2009) have suggested that the pathophysiology of BD could be associated with an accelerated aging process, as suggested by the accelerated decrease observed in BDNF levels with age in patients with BD. Also, older euthymic patients with BD have shown greater levels of oxidative lipid damage than older controls, supporting the hypothesis of a persistent effect, into late life, of reactive oxygen species in patients with BD (Andreazza et al., 2015). In fact, oxidative stress has been related and intrinsically connected to aging and life span (Finkel & Holbrook, 2000; Harman, 2009). For instance, oxidative stress causes DNA damage and stimulates inflammatory activation (Rizzo et al., 2014). Moreover, Epel et al. (2004) have pointed out that greater perceived stress was associated with higher oxidative stress and shorter TL, mediated in part by stress-related hormones (Aschbacher et al., 2013). In our sample, patients with BD showed higher levels of inflammatory and oxidative markers, and siblings showed intermediate values between those of patients and healthy controls, despite the absence of statistically significant differences in relation to patients. A tendency in siblings to present intermediate values was also found for HPA axis functioning in previous analyses of our group (Fries et al., 2014).

Our results are in accordance with previous studies showing high levels of CCL11 in patients with BD (Barbosa et al., 2013; Brietzke et al., 2009; Magalhães et al., 2014). Interestingly, CCL11 levels were higher in siblings compared to patients. This may be explained by the fact that patients are usually medicated (all our patients were), using lithium or other medications with neuroprotective properties (Berk et al., 2011). Martinsson et al. (2013) reported

a positive effect of long-term lithium treatment on TL, and longer telomeres were associated with improved lithium response in patients with BD; these findings suggest that lithium exerts a protective effect against telomere shortening and thus against aging, especially when therapeutically effective. In this vein, the findings reported by Villeda et al. (2011), which showed direct effects of systemic toxicity on the CNS, particularly of CCL11 on synaptic plasticity, neurogenesis and cognition, may shed light on the possible neurobiological vulnerability of siblings, underscoring the need to devote more attention and research to this population. From a different perspective, it could be speculated that the siblings included in the present study were resilient, as they remained without a psychiatric diagnosis despite the higher levels of CCL11 and the genetic and environmental factors shared with the patients. Of note, mean age in the group of siblings was 45.6 years, which is beyond the first peak age range of BD onset (Kroon et al., 2013).

Our findings need to be considered in light of some limitations. First, our sample size was small, and this was a cross-sectional study. It would be interesting to see the effects of a larger sample on our results, especially in parameters that showed a tendency toward intermediate, non-significant results.

In conclusion, our results reinforce the hypothesis of neurobiological trait abnormalities in individuals at genetic risk for BD and suggest that unaffected siblings may present accelerated aging features compared to healthy controls, which is in line with the genetic background shared with patients. These findings may contribute to the development of markers in genetic risk population studies and may be considered as endophenotypic traits of BD. Further prospective studies are needed to advance knowledge in this area and to clarify whether unaffected siblings are a resilient or a vulnerable group.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundo de Incentivo à Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

DISCLOSURE

Dr. Kauer-Sant’Anna has received research grants and/or speaking fees from CNPq-INCT-TM, CNPq-Universal, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Stanley Medical Research Institute (SMRI), the National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression (NARSAD), Eli Lilly, and FIPE-HCPA.

Dr. Rosa has received support from L’Oréal Brasil, Academia Brasileira de Ciências, and the UNESCO For Women in Science Commission.

Dr. Kapczinski has received grants/research support from AstraZeneca, Eli Lilly, Janssen-Cilag, Servier, CNPq, CAPES, NARSAD, and SMRI; has been a member of the speakers’ boards for AstraZeneca, Eli Lilly, Janssen and Servier; and has served as a consultant for Servier.

The others authors report no conflicts of interest.

References

Aschbacher K, O'Donovan A, Wolkowitz OM, Dhabhar FS, Su Y, Epel E. Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 2013; **38(9)**: 1698-1708.

Andreazza AC, Gildengers A, Rajji TK, Zuzarte PM, Mulsant BH, Young LT. Oxidative stress in older patients with bipolar disorder. *Am J Geriatr Psychiatry* 2015; **23(3)**: 314-9.

Antypa N, Serretti A. Family history of a mood disorder indicates a more severe bipolar disorder. *J Affect Disord* 2014; **156**: 178-186.

Arts B, Jabben N, Krabbendam L, Van Os J. Meta-analyses of cognitive functioning in euthymic bipolar patients and their first-degree relatives. *Psychol Med* 2008; **38(6)**: 771-785.

Barbosa IG, Rocha NP, Bauer ME, de Miranda AS, Huguet RB, Reis HJ, Zunszain PA, Horowitz MA, Pariante CM, Teixeira AL. Chemokines in bipolar disorder: trait or state? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2013; **263(2)**: 159-165.

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PV, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; **35(3)**: 804-817.

Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 2005; **579(4)**: 859-862.

Bojesen SE. Telomeres and human health. *Journal of Internal Medicine* 2013; **274**: 399-413.

Brietzke E, Kauer-Sant'Anna M, Teixeira AL, Kapczinski F. Abnormalities in serum chemokine levels in euthymic patients with bipolar disorder. *Brain Behav Immun* 2009; **3(8)**: 1079-1082

Cassidy A, De Vivo I, Liu Y, Han J, Prescott J, Hunter DJ, Rimm EB. Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. *Am J Clin Nutr* 2010; **91**: 1273–1280.

Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; **30(10)**: e47

Chan SR, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; **359(1441)**: 109-121.

Damjanovic AK, Yang Y, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Nguyen H, Laskowski B, Zou Y, Beversdorf DQ, Weng NP. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer's disease patients. *J Immunol* 2007; **179(6)**: 4249-54.

Ellenbogen MA, Santo JB, Linnen AM, Walker CD, Hodgins S. High cortisol levels in the offspring of parents with bipolar disorder during two weeks of daily sampling. *Bipolar Disord* 2010; **12**: 77–86.

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

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; **408(6809)**: 239-47.

Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Kimura M, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Hardikar S, Aviv A. Leukocyte telomere length and mortality in the cardiovascular health study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; **66**: 421–429.

Fries GR, Pfaffenseller B, Stertz L, Paz AV, Dargél AA, Kunz M, Kapczinski F. Staging and neuroprogression in bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep* 2012; **14(6)**: 667-75.

Fries GR, Vasconcelos-Moreno MP, Gubert C, Santos BT, Sartori J, Eisele B, Ferrari P, Fijtman A, Rüegg J, Gassen NC, Kapczinski F, Rein T, Kauer-Sant'Anna M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and illness progression in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014; **18(1)**: 1-10.

Fusar-Poli P, Howes O, Bechdolf A, Borgwardt S. Mapping vulnerability to bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis of neuroimaging studies. *J Psychiatry Neurosci* 2012; **37(3)**: 170-184.

Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology* 2009; **10(6)**: 773-781

Hartmann N, Boehner M, Groenen F, Kalb R. Telomere length of patients with major depression is shortened but independent from therapy and severity of the disease. *Depress Anxiety* 2010; **27**: 1111–1116.

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; **346**: 866–868.

Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Grassi-Oliveira R, Colom F, Berk M. Clinical implications of a staging model for bipolar disorders. *Expert Rev Neurother* 2009; **9(7)**: 957-966

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

Kessler R, McGonagle K, Zhao S et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 1994; **51**: 8–19.

Kroon JS, Wohlfarth TD, Dieleman J, Sutterland AL, Storoosum JG, Denys D, de Haan L, Sturkenboom MC. Incidence rates and risk factors of bipolar disorder in the general population: a population-based cohort study. *Bipolar Disord* 2013; **15(3)**: 306-313.

Lima IM, Barros A, Rosa DV, Albuquerque M, Malloy-Diniz L, Neves FS, Romano-Silva MA, de Miranda DM. Analysis of telomere attrition in bipolar disorder. *J Affect Disord* 2014; **172C**: 43-47.

Magalhaes PV, Jansen K, Stertz L, Ferrari P, Pinheiro RT, da Silva RA, Kapczinski F. Peripheral eotaxin-1 (CCL11) levels and mood disorder diagnosis in a population-based sample of young adults. *J Psychiatr Res* 2014; **48(1)**: 13-15.

Mansur RB, Cha DS, Asevedo E, McIntyre RS, Brietzke E. Selfish brain and neuroprogression in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; **43**: 66-71

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

Nitta E, Yamashita M, Hosokawa K, Xian M, Takubo K, Arai F, Nakada S, Suda T. Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism. *Blood* 2011; **117**: 4169–4180

Njajou OT, Cawthon RM, Blackburn EH, Harris TB, Li R, Sanders JL, Newman AB, Nalls M, Cummings SR, Hsueh WC. Shorter telomeres are associated with obesity and weight gain in the elderly. *Int J Obes* 2012; **36**: 1176–1179

Rizzo LB, Costa LG, Mansur RB, Swardfager W, Belangero SI, Grassi-Oliveira R, McIntyre RS, Bauer ME, Brietzke E. The theory of bipolar disorder as an illness of accelerated aging: implications for clinical care and research. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; **42**: 157-169.

Salpea KD, Talmud PJ, Cooper JA, Maubaret CG, Stephens JW, Abelak K, Humphries SE. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis* 2010; **209(1)**: 42-50.

Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, Nierenberg AA, Fava M, Wong KK. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol. Psychiatry* 2006; **60**: 432–435.

Sun Q, Shi L, Prescott J, Chiuve SE, Hu FB, De Vivo I, Stampfer MJ, Franks PW, Manson JE, Rexrode KM. Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women. *PLoS One* 2012; **7(5)**: e38374.

Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011; **477(7362)**: 90-94.

Weischer M, Bojesen SE, Cawthon RM, Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Short telomere length, myocardial infarction, ischemic heart disease, and early death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 822–829.

Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, Reus VI, Rosser R, Burke HM, Kupferman E, Compagnone M, Nelson JC, Blackburn EH. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress - preliminary findings. *PLoS One* 2011; **6(3)**: e17837

Wong LS, van der Harst P, de Boer RA, Huzen J, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Aging, telomeres and heart failure. *Heart Fail Rev* 2010; **15(5)**: 479-486

Yatham LN, Kennedy SH, O'Donovan C, Parikh S, MacQueen G, McIntyre R, Sharma V, Silverstone P, Alda M, Baruch P, Beaulieu S, Daigneault A, Milev R, Young LT, Ravindran A, Schaffer A, Connolly M, Gorman CP. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies. *Bipolar Disord* 2005; **7(3)**: 5-69.

Yatham LN, Kapczinski F, Andreazza AC, Trevor Young L, Lam RW, Kauer-Sant'Anna M. Accelerated age-related decrease in brain-derived neurotrophic factor levels in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; **12(1)**: 137-139

5 - Discussão e Considerações Finais:

A partir dos dados apresentados, nossos resultados sugerem que a relação de parentesco de primeiro grau com pacientes com TB está associada a mudanças em biomarcadores, sobretudo marcadores de envelhecimento precoce, e na funcionalidade psicossocial deste grupo de indivíduos.

Em síntese, os achados dessa tese são:

- 1) Houve diferenças significativas entre pacientes e controles saudáveis em relação a memória verbal e funções executivas, mas não entre os irmãos e controles. Os pacientes apresentaram pior desempenho nas tarefas cognitivas avaliadas.
- 2) Os pacientes apresentaram maior prejuízo funcional em comparação com controles saudáveis em todos os domínios da FAST, e pior funcionalidade em comparação com os irmãos; os irmãos, por sua vez, apresentaram pior funcionalidade em relação aos controles apenas nos domínios cognição, relacionamento interpessoal e lazer da FAST.
- 3) Verificou-se encurtamento de telômeros em pacientes quando comparados aos controles saudáveis, mas não há diferenças entre os pacientes e os irmãos; os irmãos mostraram tendência a ser diferentes dos controles ($p=0.05$).
- 4) A citocina CCL11, considerada um marcador de envelhecimento, estava significativamente aumentada em irmãos quando comparada aos controles; e uma tendência foi encontrado para a comparação entre pacientes e controles.
- 5) Os níveis de IL-6 e IL-10 foram significativamente maiores em pacientes quando comparados aos controles, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os pacientes e os irmãos.

- 6) A atividade de GPx estava significativamente reduzida em pacientes quando comparados aos controles e a irmãos; os irmãos apresentaram valores intermediários. Não houve diferenças nos níveis de atividade GR, GST, nem nos níveis séricos de 3-NT entre os grupos.
- 7) O BDNF não diferiu entre os grupos.

Esses dados em irmãos de pacientes com TB são originais, principalmente em relação à avaliação de funcionalidade, de marcadores de envelhecimento precoce e de biomarcadores de estresse oxidativo, inflamação e neurotrofinas. Em relação à cognição em irmãos, existem estudos prévios que avaliaram memória verbal e funções executivas em familiares de primeiro grau de pacientes com TB. Os resultados foram amplamente discutidos e comparados com dados da literatura na sessão “Discussion” nos artigos 1 e 2 (acima).

O presente estudo sugere que irmãos não afetados apresentam pior funcionalidade psicossocial que os controles saudáveis; tal achado possivelmente se relaciona ao fato de dividirem características genéticas com os pacientes e também possivelmente a fatores ambientais compartilhados ou não.

Além disso, destacam-se achados de envelhecimento precoce em irmãos não afetados, reforçando a ideia de que o envelhecimento precoce pode fazer parte dos processos fisiopatológicos do TB, reforçando também que estados pró-inflamatórios e pró-oxidativos podem contribuir com esse processo. Essa característica encontra-se presente em indivíduos não afetados pelo TB, o que também pode estar associado tanto a fatores genéticos quanto a ambientais, e está em conformidade com a ideia de endofenótipos.

Quando analisado em conjunto, os achados presentes levantam questionamentos importantes:

Os irmãos não afetados de pacientes com TB podem ser considerados vulneráveis sob o ponto de vista neurobiológico e merecem mais cuidado e atenção de pesquisas que visem à prevenção ou ao desenvolvimento de intervenções precoces?

Ou estamos diante de indivíduos resilientes, que apesar de apresentarem características genéticas semelhantes e alterações em biomarcadores, não desenvolveram TB ou outras doenças psiquiátricas porque apresentam mecanismos de proteção?

Não temos substrato para responder a essas perguntas. Mas qualquer que seja a resposta, ela reforça a importância de seguir estudando familiares de primeiro grau. É importante salientar que a média de idade dos irmãos nessa pesquisa é 45.6 anos, que está fora do pico de idade de início do TB (Kroon et al., 2013). Esse foi um dos motivos pelos quais decidimos estudar irmãos em vez de filhos de pacientes bipolares, já que filhos podem, na realidade, tratar-se de futuros pacientes e esse seria fator maior de confusão; irmãos, entretanto, também podem vir futuramente a desenvolver a doença, embora seja menos provável considerando a idade média de início do TB.

Tais achados precisam ser considerados à luz das suas limitações: temos um tamanho amostral relativamente pequeno para detectar diferenças mais sutis e este é um estudo transversal. Seria interessante ver os efeitos de uma amostra maior em nossos resultados, especialmente em parâmetros que apresentaram tendência a ser intermediários, mas não apresentaram relevância estatística. Por outro lado, precisamos avaliar a real relevância/tradução clínica e tamanho de efeito destes achados neurobiológicos intermediários, que somente serão esclarecidos em estudos prospectivos de longo prazo. Ainda, podemos estar diante de fatores inespecíficos associados a psicopatologia, dependendo dos achados em outros transtornos, considerando que achados em marcadores de envelhecimento precoce e neuroplasticidade já

foram descritos na depressão e esquizofrenia e este estudo incluiu apenas familiares de pacientes com TB.

A despeito das limitações citadas acima, os achados deste trabalho podem auxiliar no avanço do conhecimento sobre a neurobiologia de familiares de primeiro grau de pacientes com TB, considerados população com risco genético. Além disso, funcionalidade psicossocial, encurtamento de telômeros e níveis séricos de CCL11 talvez possam ser considerados endofenótipos, ou mais recentemente, ser considerados mais próximos de integrar um aspecto de RDoc (Research Domain Criteria) quando os sintomas subclínicos ou aspectos da cognição puderem ser associados a fatores neurobiológicos consistentes. O conjunto de dados produzido neste trabalho avança na direção da identificação precoce do TB e na melhor compreensão das alterações em um provável estágio latente e qual seu significado clínico.

6- Referências da Tese:

Almasy L, Blangero JC. Endophenotypes as quantitative risk factors for psychiatric disease: rationale and study design. *Am J Med Genet A* 2001; **105(1)**: 42–44.

Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Ceresér KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Gonçalves CA. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* 2007a.; **41(6)**: 523–529

Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, Gonçalves CA, Kapczinski F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 2007b; **153(1)**: 27-32.

Andreazza AC, Kauer-Sant’anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* 2008; **111(2–3)**: 135–144

Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2010. **67(4)**: 360–368

Angst J, Azorin JM, Bowden CL, Perugi G, Vieta E, Gamma A, Young AH. Prevalence and characteristics of undiagnosed bipolar disorders in patients with a major depressive episode: the BRIDGE study. *Arch Gen Psychiatry* 2011; **68(8)**: 791-798.

Antypa N, Serretti A. Family history of a mood disorder indicates a more severe bipolar disorder. *J Affect Disord* 2014; **156**: 178-186.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.) 2013; Washington, DC.

Arts B, Jabben N, Krabbendam L, Van Os J. Meta-analyses of cognitive functioning in euthymic bipolar patients and their first-degree relatives. *Psychol. Med* 2008. **38(6)**: 771-785.

Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, Siegel G, Bergman A, Huffman DM, Schechter CB, Wright WE, Shay JW, Barzilai N, Govindaraju DR, Suh Y. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107(1)**: 1710-1717

Barbosa IG, Rocha NP, Bauer ME, de Miranda AS, Huguet RB, Reis HJ, Zunszain PA, Horowitz MA, Pariante CM, Teixeira AL. Chemokines in bipolar disorder: trait or state? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2013; **263(2)**: 159-165

Barrett SL, Mulholland CC, Cooper SJ, Rushe TM. Patterns of neurocognitive impairment in first episode bipolar disorder and schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2009; **195(1)**: 67-72.

Bauer IE, Pascoe MC, Wollenhaupt-Aguiar B, Kapczinski F, Soares JC. Inflammatory mediators of cognitive impairment in bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 2014; **56**: 18-27

Bella T, Goldstein T, Axelson D, Obreja M, Monk K, Hickey MB, Goldstein B, Brent D, Diler RS, Kupfer D, Sakolsky D, Birmaher B. Psychosocial functioning in offspring of parents with bipolar disorder. *J Affect Disord* 2011; **133**: 204–211

Berk M, Conus P, Lucas N, Hallam K, Malhi GS, Dodd S, Yatham LN, Yung A, McGorry P. Setting the stage: from prodrome to treatment resistance in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2007a; **9(7)**: 671-678.

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

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PV, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; **35(3)**: 804-817.

Blangero J. Localization and identification of human quantitative trait loci: king harvest has surely come. *Curr Opin Genet Dev* 2004; **14(3)**: 233–240.

Bojesen SE. Telomeres and human health. *Journal of Internal Medicine* 2013; **274**: 399–413

Bourdon K, Rae D, Locke B, Narrow W, Regier D. Estimating the prevalence of mental disorders in US adults from the Epidemiologic Catchment Area Survey. *Public Health Rep* 1992; **107**: 663–668.

Brietzke E, Kauer-Sant'Anna M, Teixeira AL, Kapczinski F. Abnormalities in serum chemokine levels in euthymic patients with bipolar disorder. *Brain Behav Immun* 2009; **3(8)**: 1079-1082

Brietzke E, Mansur RB, Soczynska JK, Kapczinski F, Bressan RA, McIntyre RS. Towards a multifactorial approach for prediction of bipolar disorder in at risk populations. *J Affect Disord* 2012; **140(1)**: 82-91.

Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy Vargas A, Chies JA, Kapczinski F. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord* 2009; **116(3)**: 214–217.

Cassidy A, De Vivo I, Liu Y, Han J, Prescott J, Hunter DJ, Rimm EB. Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. *Am J Clin Nutr* 2010; **91**: 1273–1280.

Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci.* 2006; **110(2)**: 167–173

Civil Arslan F, Tiryaki A, Ozkorumak E. A comparison of euthymic bipolar patients with unaffected first-degree relatives and healthy controls in terms of neuropsychological functions.

Int. J. Psychiatry Clin. Pract 2014; **18(3)**: 208-214.

Comuzzie A, Hixson J, Almasy L, Mitchell B, Mahaney M, Dyer T, Stern M, MacCluer J, Blangero J. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nature Genetics* 1997; **15(3)**: 273–276.

Craddock N, Jones I. Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet* 1999; **36**: 585–594.

Craddock N, Sklar P Genetics of bipolar disorder. *Lancet*. 2013; **381(9878)**: 1654-1662.

de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; **19**: 2100–2110.

De Sousa RT, Van de Bilt MT, Diniz BS, Ladeira RB, Portela LV, Souza DO, et al. Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. *Neurosci Lett* 2011; **494**: 54-56.

Dickerson F, Stallings C, Origoni A, Boronow J, Yolken R. Elevated serum levels of C-reactive protein are associated with mania symptoms in outpatients with bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; **31(4)**: 952 - 925.

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders.

Biol Psychiatry 2006; **59(12)**: 1116-1127.

Ellenbogen MA, Santo JB, Linnen AM, Walker CD, Hodgins S. High cortisol levels in the offspring of parents with bipolar disorder during two weeks of daily sampling. *Bipolar Disord* 2010; **12**: 77–86.

Ellenbogen MA, Linnen AM, Santo JB, Rot M, Hodgins S, Young SN. Salivary cortisol and interpersonal functioning: An event-contingent recording study in the offspring of parents with bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2013; **38**: 997-1006.

Ferensztajn E, Skibinska M, Kaczmarek M, Losy J, Rybakowski JK. Neurobiology and temperament in the offspring of excellent lithium responders. *World J Biol Psychiatry* 2014; **4**: 1-6.

Fernandes BS, Gama CS, Ceresér KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, de Lucena D, Kunz M, Gomes FA, Kapczinski F. 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; **45(8)**: 995-1004.

Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Kimura M, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Hardikar S, Aviv A. Leukocyte Telomere Length and Mortality in the Cardiovascular Health Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; **66**: 421–429.

Fries GR, Vasconcelos-Moreno MP, Gubert C, Santos BT, Sartori J, Eisele B, Ferrari P, Fijtman A, Rüegg J, Gassen NC, Kapczinski F, Rein T, Kauer-Sant'Anna M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and illness progression in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014; **18(1)**: 1-10.

Fusar-Poli P, Howes O, Bechdolf A, Borgwardt S. Mapping vulnerability to bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis of neuroimaging studies. *J Psychiatry Neurosci* 2012; **37(3)**: 170-184.

Gardner HH, Kleinman NL, Brook RA, Rajagopalan K, Brizee TJ, Smeeding JE. The economic impact of bipolar disorder in an employed population from an employer perspective. *J Clin Psychiatry* 2006; **67**: 1209–1218.

Gawryluk JW, Wang JF, Andreatza AC, Shao L, Young LT. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; **14(1)**: 123–130

Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet* 2013; **381(9878)**: 1672-1682.

Gershon ES, Goldin LR. Clinical methods in psychiatric genetics. I. Robustness of genetic marker investigative strategies. *Acta Psychiatr Scand* 1986; **74(2)**: 113-138.

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.

Scandinavian Journal of Immunology 2003; **57(5)**: 493–497.

Glahn DC, Curran JE, Winkler AM, Carless MA, Kent JW, Charlesworth JC, Johnson MP, Göring HH, Cole SA, Dyer TD, Moses EK, Olvera RL, Kochunov P, Duggirala R, Fox PT, Almasy L, Blangero J. High dimensional endophenotype ranking in the search for major depression risk genes. *Biol Psychiatry* 2012; **71(1)**: 6–14.

Glahn DC, Knowles EE, McKay DR, Sprooten E, Raventós H, Blangero J, Gottesman II, Almasy L. Arguments for the sake of endophenotypes: examining common misconceptions about the use of endophenotypes in psychiatric genetics. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2014; **165B(2)**: 122-130.

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

Gonzalez-Pinto AM, Dardennes R, de Zélicourt M, López P, Oliveros RG, Vieta E, Barbeito S, Echevarria E, Fagnani F. In-patient care costs of patients with bipolar I disorder: a comparison between two European centers. *J Affect Disord* 2010; **121**: 152–155.

Gottesman II, Gould TD. The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions. *American Journal of Psychiatry* 2003; **160**: 636–645.

Grande I, Kapczinski F, Stertz L, Colpo GD, Kunz M, Cereser KM, Kauer-Sant'Anna M, Frey B, Vieta E, Magalhaes PV. Peripheral brain-derived neurotrophic factor changes along treatment with extended release quetiapine during acute mood episodes: an open-label trial in drug-free patients with bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 2012; **46(11)**: 1511-1514

Halliwell B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 2011; **32(3)**: 125–130

Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* 2012; **37(1)**: 137-62.

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; **346**: 866–868.

Hill SK, Reilly JL, Harris MS, Rosen C, Marvin RW, Deleon O, Sweeney JA. A comparison of neuropsychological dysfunction in first-episode psychosis patients with unipolar depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Schizophr. Res* 2009; **113(2–3)**: 167–175.

Hirshfeld-Becker DR, Biederman J, Henin A, Faraone SV, Dowd ST, De Petrillo LA, Markowitz SM, Rosenbaum JF. Psychopathology in the young offspring of parents with bipolar disorder: a controlled pilot study. *Psychiatry Res* 2006; **145(2-3)**: 155-167.

Judd LL, Schettler PJ, Akiskal HS. The prevalence, clinical relevance, and public health significance of subthreshold depressions. *Psychiatr Clin North Am* 2002; **25(4)**: 685-98.

Kammerer CM, Schneider JL, Cole SA, Hixson JE, Samollow PB, O'Connell JR, Perez R, Dyer TD, Almasy L, Blangero J, Bauer RL, Mitchell BD. Quantitative trait loci on chromosomes 2p, 4p, and 13q influence bone mineral density of the forearm and hip in Mexican Americans. *J Bone Miner Res* 2003; **18(12)**: 2245–2252.

Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, Kauer-Sant'anna M, Grassi-Oliveira R, Post RM. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; **32(4)**: 675-692.

Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Grassi-Oliveira R, Colom F, Berk M. Clinical implications of a staging model for bipolar disorders. *Expert Rev Neurother* 2009a; **9(7)**: 957-966

Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M, Brietzke E, Vázquez GH, Vieta E, Berk M. The potential use of biomarkers as an adjunctive tool for staging bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009b; **33(8)**: 1366-1371.

Kathiresan S, Willer C, Peloso G, Demissie S, Musunuru K, Schadt E, Kaplan L, Bennett D, Li Y, Tanaka T, Voight B, Bonnycastle L, Jackson A, Crawford G, Surti A, Guiducci C, Burt N, Parish S, Clarke R, Zelenika D, Kubalanza K, Morken M, Scott L, Stringham H, Galan P, Swift

A, Kuusisto J, Bergman R, Sundvall J, Laakso M, Ferrucci L, Scheet P, Sanna S, Uda M, Yang Q, Lunetta K, Dupuis J, de Bakker P, O'Donnell C, Chambers J, Kooner J, Hercberg S, Meneton P, Lakatta E, Scuteri A, Schlessinger D, Tuomilehto J, Collins F, Groop L, Altshuler D, Collins R, Lathrop G, Melander O, Salomaa V, Peltonen L, Orho-Melander M, Ordovas J, Boehnke M, Abecasis G, Mohlke K, Cupples L. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009; **41(1)**: 56–65.

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

Keck PE Jr. Defining and improving response to treatment in patients with bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 2004; **65(15)**: 25-29.

Kessing LV, Hansen MG, Andersen PK, Angst J. The predictive effect of episodes on the risk of recurrence in depressive and bipolar disorders - a life-long perspective. *Acta Psychiatr Scand* 2004; **109(5)**: 339-344.

Kessing LV, Mortensen PB, Bolwig TG. Clinical definitions of sensitisation in affective disorder: a case register study of prevalence and prediction. *J Affect Disord* 1998; **47(1-3)**: 31-39.

Kessler R, McGonagle K, Zhao S et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 1994; **51**: 8–19.

Kieseppa T, Partonen T, Haukka J, et al. High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. *Am J Psychiatry* 2004; **161**: 1814–1821.

Kroon JS, Wohlfarth TD, Dieleman J, Sutterland AL, Storosum JG, Denys D, de Haan L, Sturkenboom MC. Incidence rates and risk factors of bipolar disorder in the general population: a population-based cohort study. *Bipolar Disord* 2013; **15(3)**: 306-313.

Krüger S, Alda M, Young LT, Goldapple K, Parikh S, Mayberg HS. Risk and resilience markers in bipolar disorder: brain responses to emotional challenge in bipolar patients and their healthy siblings. *Am J Psychiatry* 2006; **163(2)**: 257-264.

Kulkarni S, Jain S, Janardhan Reddy YC, Kumar KJ, Kandavel T. Impairment of verbal learning and memory and executive function in unaffected siblings of probands with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2010; **12(6)**: 647-656.

Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008; **32(7)**: 1677–1681

Linnen AM, Rot M, Ellenbogen MA, Young SN. Interpersonal functioning in adolescent offspring of parents with bipolar disorder. *J Affect Disord* 2009; **114**: 122–130.

Lima IM, Barros A, Rosa DV, Albuquerque M, Malloy-Diniz L, Neves FS, Romano-Silva MA, de Miranda DM. Analysis of telomere attrition in bipolar disorder. *J Affect Disord* 2014; **172C**: 43-47.

Lommatzsch M , Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Paus R, Fischer A, Lewin GR, Renz H. Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *American Journal of Pathology* 1999; **155(4)**: 1183–1193.

Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V Jr, da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, Gentil V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci. Lett* 2007; **421(1)**: 33–36

Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord* 2009; **11**: 92-109

Mackala SA, Torres IJ, Kozicky J, Michalak EE, Yatham LN. Cognitive performance and quality of life early in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord* 2014; **168**: 119–124.

Maes M, Bosmans E, Calabrese J, Smith R, Meltzer HY. Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. *J Psychiatr Res* 1995; **29(2)**: 141–52.

Magalhães PVS, Fries GR, Kapczinski F. Marcadores periféricos e a fisiopatologia do transtorno bipolar. *Rev Psiq Clín* 2012a; **39(2)**: 60-67

Magalhães PV, Jansen K, Pinheiro RT, Colpo GD, da Motta LL, Klamt F, da Silva RA, Kapczinski F. Peripheral oxidative damage in early-stage mood disorders: a nested population-based case-control study. *Int J Neuropsychopharmacol* 2012b; **15(8)**: 1043-1050.

Magalhaes PV, Jansen K, Stertz L, Ferrari P, Pinheiro RT, da Silva RA, Kapczinski F. Peripheral eotaxin-1 (CCL11) levels and mood disorder diagnosis in a population-based sample of young adults. *J Psychiatr Res* 2014; **48(1)**: 13-15.

Martínez-Arán A, Vieta E, Reinares M, Colom F, Torrent C, Sánchez-Moreno J, Benabarre A, Goikolea JM, Comes M, Salamero M. Cognitive function across manic or hypomanic, depressed, and euthymic states in bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 2004a; **161(2)**: 262-270.

Martínez-Arán A, Vieta E, Colom F, Torrent C, Sánchez-Moreno J, Reinares M, Benabarre A, Goikolea JM, Brugué E, Daban C, Salamero M. Cognitive impairment in euthymic bipolar patients: implications for clinical and functional outcome. *Bipolar Disord* 2004b; **6(3)**: 224-232.

Martinez-Aran A, Vieta E, Torrent C, Sanchez-Moreno J, Goikolea JM, Salamero M, Malhi GS, Gonzalez-Pinto A, Daban C, Alvarez-Grandi S, Fountoulakis K, Kaprinis G, Tabares-Seisdedos R, Ayuso-Mateos JL. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar Disord* 2007; **9**: 103–113.

Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 2007; **10(9)**: 1089–1093.

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

McElroy SL, Altshuler LL, Suppes T, Keck PE Jr, Frye MA, Denicoff KD, Nolen WA, Kupka RW, Leverich GS, Rochussen JR, Rush AJ, Post RM. Axis I psychiatric comorbidity and its relationship to historical illness variables in 288 patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 2001; **158(3)**: 420-426

McGorry PD, Purcell R, Hickie IB, Yung AR, Pantelis C, Jackson HJ. Clinical staging: a heuristic model for psychiatry and youth mental health. *Med J Aust* 2007; **187(7)**: S40-2.

McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry* 2003; **60**: 497–502.

Mesman E, Hillegers MH, Ambree O, Arolt V, Nolen WA, Drexhage HA. Monocyte activation, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and S100B in bipolar offspring: a follow-up study from adolescence into adulthood. *Bipolar Disord* 2015; **17(1)**: 39-49

Mur M, Portella MJ, Martinez-Aran A, Pifarre J, Vieta E. Influence of clinical and neuropsychological variables on the psychosocial and occupational outcome of remitted bipolar patients. *Psychopathology* 2009; **42**: 148–156.

Nehra R, Grover S, Sharma S, Sharma A, Sarkar S. Neuro-cognitive functioning in unaffected siblings of patients with bipolar disorder: Comparison with bipolar patients and healthy controls. *Indian J. Psychiatry* 2014; **56(3)**: 283-288.

Nitta E, Yamashita M, Hosokawa K, Xian M, Takubo K, Arai F, Nakada S, Suda T. Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism. *Blood* 2011; **117**: 4169–4180

Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, Blackburn EH, Mitchell BD, Shuldiner AR, Hsueh WC. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci* 2007; **104**: 12135–12139.

Njajou OT, Cawthon RM, Blackburn EH, Harris TB, Li R, Sanders JL, Newman AB, Nalls M, Cummings SR, Hsueh WC. Shorter telomeres are associated with obesity and weight gain in the elderly. *Int J Obes* 2012; **36**: 1176–1179

O'Brien SM, Scully P, Scott LV, Dinan TG. Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Disord* 2006; **90(2-3)**: 263–267.

Olmez I, Ozyurt H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int* 2012; **60(2)**: 208–212

Ortiz-Domínguez A, Hernández ME, Berlanga C, Gutiérrez-Mora D, Moreno J, Heinze G, Pavón L. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disorders* 2007; **9(6)**: 596–602

Ostiguy CS, Ellenbogen MA, Hodgins S. Personality of parents with bipolar disorder and interpersonal functioning among their offspring: A prospective 10-year study. *Dev Psychopathol* 2012; **24**: 573–587.

Park MH, Chang KD, Hallmayer J, Howe ME, Kim E, Hong SC, Singh MK. Preliminary study of anxiety symptoms, family dysfunction, and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met genotype in offspring of parents with bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 2015; **61**: 81-88.

Pfaffenseller B, Fries GR, Wollenhaupt-Aguiar B, Colpo GD, Stertz L, Panizzutti B, Magalhães PV, Kapczinski F. Neurotrophins, inflammation and oxidative stress as illness activity biomarkers in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 2013; **13(7)**: 827-842

Pillai A, Kale A, Joshi S, Naphade N, Raju MS, Nasrallah H, Mahadik SP. Decreased BDNF levels in CSF of drug-naïve first-episode psychotic subjects: correlation with plasma BDNF and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; **13(4)**: 535–539

Post RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: Clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res* 2007; **41(12)**: 979-990

Post RM, Fleming J, Kapczinski F. Neurobiological correlates of illness progression in the recurrent affective disorders. *J Psychiatr Res* 2012; **46(5)**: 561-573.

Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, Wagh UV, Debsikdar VB, Mahadik SP. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res* 2003; **121(2)**: 109–122

Rizzo LB, Costa LG, Mansur RB, Swardfager W, Belangero SI, Grassi-Oliveira R, McIntyre RS, Bauer ME, Brietzke E. The theory of bipolar disorder as an illness of accelerated aging: implications for clinical care and research. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; **42**: 157-169.

Robinson LJ, Ferrier IN. Evolution of cognitive impairment in bipolar disorder: a systematic review of cross-sectional evidence. *Bipolar Disord* 2006; **8(2)**: 103-116.

Rosa AR, Sánchez-Moreno J, Martínez-Aran A, Salamero M, Torrent C, Reinares M, Comes M, Colom F, Van Riel W, Ayuso-Mateos JL, Kapczinski F, Vieta E. Validity and reliability of the Functioning Assessment Short Test (FAST) in bipolar disorder. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* 2007; **7**: 3-5.

Savage SA, Bertuch AA. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med* 2010; **12**: 753–764.

Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, Yumru M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord* 2008; **107(1-3)**: 89–94

Shurin GV, Yurkovetsky ZR, Chatta GS, Tourkova IL, Shurin MR, Lokshin AE. Dynamic alteration of soluble serum biomarkers in healthy aging. *Cytokine* 2007; **39(2)**: 123-129.

Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack H, Nierenberg AA, Fava M, Wong KK. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry* 2006; **60**: 432–435

Sing CF, Stengård JH, Kardina SL. Genes, environment, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23(7)**: 1190–1196.

Sun Q, Shi L, Prescott J, Chiuve SE, Hu FB, De Vivo I, Stampfer MJ, Franks PW, Manson JE, Rexrode KM. Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women. *PLoS One* 2012; **7(5)**: e38374.

Tohen M, Hennen J, Zarate CM Jr, Baldessarini RJ, Strakowski SM, Stoll AL, Faedda GL, Suppes T, Gebre-Medhin P, Cohen BM. Two-year syndromal and functional recovery in 219 cases of first-episode major affective disorder with psychotic features. *Am J Psychiatry* 2000; **157(2)**: 220-228.

Torres JJ, Boudreau VG, Yatham LN. Neuropsychological functioning in euthymic bipolar disorder: a meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand* 2007; **434**: 17-26

Torres JJ, DeFreitas VG, DeFreitas CM, Kauer-Sant'Anna M, Bond DJ, Honer WG, Lam RW, Yatham LN. Neurocognitive functioning in patients with bipolar I disorder recently recovered from a first manic episode. *J Clin Psychiatry* 2010; **71(9)**: 1234–1242.

Tsai SY, Chen KP, Yang YY, Chen CC, Lee JC, Singh VK, Leu SJ. Activation of indices of cell-mediated immunity in bipolar mania. *Biol Psychiatry* 1999; **45(8)**: 989–994.

Tsai SY, Yang YY, Kuo CJ, Chen CC, Leu SJ. Effects of symptomatic severity on elevation of plasma soluble interleukin-2 receptor in bipolar mania. *J Affect Disord* 2001; **64(2-3)**: 185–193.

Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011; **477(7362)**: 90-94.

Weischer M, Bojesen SE, Cawthon RM, Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Short telomere length, myocardial infarction, ischemic heart disease, and early death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 822–829.

Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, Reus VI, Rosser R, Burke HM, Kupferman E, Compagnone M, Nelson JC, Blackburn EH. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress - preliminary findings. *PLoS One* 2011; **6(3)**: e17837

Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Reus VI, Rosser R, Burke H, Compagnone M, Nelson JC, Dhabhar FS, Blackburn EH. Resting leukocyte telomerase activity is elevated in major depression and predicts treatment response. *Mol Psychiatry* 2012; **17**: 164–172

World Health Organization. The Global Burden of Disease - 2004 Up Date

http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf

Yatham LN, Kennedy SH, O'Donovan C, Parikh S, MacQueen G, McIntyre R, Sharma V, Silverstone P, Alda M, Baruch P, Beaulieu S, Daigneault A, Milev R, Young LT, Ravindran A, Schaffer A, Connolly M, Gorman CP. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies. *Bipolar Disord* 2005; **7(3)**: 5-69.

7 - Anexos:

Anexo 1: Termos de Consentimento Livre e Esclarecido : Pacientes, Familiares e Controles

28

ANEXO A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Gostaríamos de convidá-lo a participar do estudo: "FATORES ASSOCIADOS A VULNERABILIDADE VERSUS RESILIÊNCIA NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR – UM ESTUDO COM FAMILIARES EM ALTO RISCO". Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo você poderá contatar a pesquisadora executora Mirela P Vasconcelos Moreno ou a pesquisadora supervisora Marcia Sant'Anna pelo telefone: (51) 3359-8845 (Laboratório de Psiquiatria Molecular – HCPA) ou o Comitê de Ética pelo telefone: (51) 3359-8304.

Qual o objetivo desta pesquisa?

Esse estudo tem por objetivo entender melhor como funciona a relação entre o Transtorno de Humor Bipolar e os familiares de primeiro grau dos pacientes com essa doença. Ou seja, conhecer características clínicas dos familiares dos pacientes com Transtorno de Humor Bipolar e tentar avaliar se há associação dessas características com o Transtorno de Humor Bipolar.

O que acontecerá neste estudo?

Depois que você responder às questões em estudo através de questionários, será feito um exame de sangue. Esse exame será utilizado para observar se há alterações de substâncias encontradas no sangue e para pesquisar possíveis alterações genéticas; ambos relacionados ao Transtorno de Humor Bipolar.

Quais os benefícios em participar deste estudo?

A sua participação neste estudo poderá, no âmbito pessoal, permitir a identificação de algum possível problema antes não conhecido, e no âmbito coletivo, ajudar a desenvolver maior conhecimento sobre familiares de primeiro grau de pacientes com Transtorno de Humor Bipolar.

Quais são os direitos dos participantes?

Os pesquisadores desse estudo talvez precisem examinar os seus registros, a fim de verificar informações. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados desse estudo poderão ser enviados para publicação em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação ou do seu familiar no estudo é voluntária, de forma que caso você decida, em qualquer momento do estudo, não participar, isto não afetará o tratamento normal a que você tem direito. Além disso, sua participação na pesquisa não significa que seu familiar será acompanhado em programa de ambulatório desta instituição. Em caso de necessidade de atendimento médico, o participante (familiar) será encaminhado à Unidade Básica de Saúde mais próxima a sua casa ou, tratando-se de emergência psiquiátrica, ao Posto

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
21 JAN / 2011
100503 TAV

da Cruzeiro do Sul – PACS (participantes residentes em Porto Alegre) ou ao IAPI (participantes residentes na Zona Norte de Porto Alegre) ou ao Hospital São Pedro (participantes que não residem em Porto Alegre).

Os procedimentos da pesquisa não serão cobrados do participante, e este receberá uma segunda via desse Termo para arquivo em documentos pessoais.

Quais são os riscos que envolvem este estudo?

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de punção venosa, como mal-estar passageiro e/ou manchas roxas no local. Além disso, você poderá sentir-se desconfortável ao responder o questionário proposto, pois no mesmo constam perguntas relativas à sua vida pessoal.

Quais são as responsabilidades dos participantes?

Os participantes desse estudo comprometem-se a responder os questionários sem omitir informações.

Declaro que:

1. Concordo voluntariamente em fazer parte desse estudo. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento. Concordo em liberar as informações dos meus registros médicos sob o entendimento de que elas serão tratadas confidencialmente.

Nome do paciente: _____

Assinatura do Paciente

Data: (__ / __ / __)

Nome do responsável legal (se aplicado): _____

Assinatura do Responsável

Data: (__ / __ / __)

Assinatura do pesquisador

Data: (__ / __ / __)

HCPA / GPP
VERSÃO APROVADA
31 / JAN / 2011
100503 TAV

ANEXO A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido
TÉRMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA FAMILIARES

Gostaríamos de convidá-lo a participar do estudo: "FATORES ASSOCIADOS À VULNERABILIDADE VERSUS RESILIÊNCIA NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR – UM ESTUDO COM FAMILIARES EM ALTO RISCO". Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo você poderá contatar a pesquisadora executora Mirela P Vasconcelos Moreno ou a pesquisadora supervisora Marcia Sant'Anna pelo telefone: (51) 3359-8845 (Laboratório de Psiquiatria Molecular – HCPA) ou o Comitê de Ética pelo telefone: (51) 3359-8304.

Qual o objetivo desta pesquisa?

Esse estudo tem por objetivo entender melhor como funciona a relação entre o Transtorno de Humor Bipolar e os familiares de primeiro grau dos pacientes com essa doença. Ou seja, conhecer características clínicas dos familiares dos pacientes com Transtorno de Humor Bipolar e tentar avaliar se há associação dessas características com o Transtorno de Humor Bipolar.

O que acontecerá neste estudo?

Depois que você responder às questões em estudo através de questionários, será feito um exame de sangue. Esse exame será utilizado para observar se há alterações de substâncias encontradas no sangue e para pesquisar possíveis alterações genéticas; ambos relacionados ao Transtorno de Humor Bipolar.

Quais os benefícios em participar deste estudo?

A sua participação neste estudo poderá, no âmbito pessoal, permitir a identificação de algum possível problema antes não conhecido, e no âmbito coletivo, ajudar a desenvolver maior conhecimento sobre familiares de primeiro grau de pacientes com Transtorno de Humor Bipolar.

Quais são os direitos dos participantes?

Seus dados médicos obtidos no estudo serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados desse estudo poderão ser enviados para publicação em um jornal científico, mas você não será identificado por nome.

Sua participação na pesquisa não significa que você será acompanhado em programa de ambulatório desta instituição. Em caso de necessidade de atendimento médico, o participante será encaminhado à Unidade Básica de Saúde mais próxima a sua casa ou, tratando-se de emergência psiquiátrica, ao Posto da Cruzeiro do Sul – PACS (participantes residentes em Porto Alegre) ou ao IAPI (participantes residentes na Zona Norte de Porto Alegre) ou ao Hospital São Pedro (participantes que não residem em Porto Alegre).

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 31 / Jan / 2011
 100503 TRV

Os procedimentos da pesquisa não serão cobrados do participante, e este receberá uma segunda via desse Termo para arquivo em documentos pessoais. O participante tem direito de desistir da pesquisa a qualquer momento, sem que haja prejuízo ao tratamento regular que seu familiar realiza no PROTAHBI.

Quais são os riscos que envolvem este estudo?

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de punção venosa, como mal-estar passageiro e/ou manchas roxas no local. Além disso, você poderá sentir-se desconfortável ao responder o questionário proposto, pois no mesmo constam perguntas relativas à sua vida pessoal.

Quais são as responsabilidades dos participantes?

Os participantes desse estudo comprometem-se a responder os questionários sem omitir informações.

Declaro que:

1. Concordo voluntariamente em fazer parte desse estudo. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento. Concordo em liberar as informações dos meus registros médicos sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.

Nome do paciente: _____

Assinatura do Paciente _____

Data: (/ /)

Nome do responsável legal (se aplicado): _____

Assinatura do Responsável _____

Data: (/ /)

Assinatura do pesquisador _____

Data: (/ /)

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 31 Jan/2011
 100503 TKV

ANEXO A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES

Gostaríamos de convidá-lo a participar do estudo: "FATORES ASSOCIADOS À VULNERABILIDADE VERSUS RESILIÊNCIA NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR – UM ESTUDO COM FAMILIARES EM ALTO RISCO". Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo você poderá contatar a pesquisadora executora Mirela P Vasconcelos Moreno ou a pesquisadora supervisora Marcia Sant'Anna pelo telefone: (51) 3359-8845 (Laboratório de Psiquiatria Molecular – HCPA) ou o Comitê de Ética pelo telefone: (51) 3359-8304.

O que é o grupo controle, nesse estudo?

É um grupo de pessoas sem doença psiquiátrica e sem familiar com doença psiquiátrica que se disponibilizará a contribuir fornecendo seus dados que serão usados como referência padrão no estudo.

Qual o objetivo desta pesquisa?

Esse estudo tem por objetivo entender melhor como funciona a relação entre o Transtorno de Humor Bipolar e os familiares de primeiro grau dos pacientes com essa doença.

O que acontecerá neste estudo?

Depois que você responder às questões em estudo através de questionários, será feito um exame de sangue. Esse exame será utilizado para observar se há alterações de substâncias encontradas no sangue e para pesquisar possíveis alterações genéticas; ambos relacionados ao Transtorno de Humor Bipolar.

Quais os benefícios em participar deste estudo?

A sua participação neste estudo poderá, no âmbito pessoal, permitir a identificação de algum possível problema antes não conhecido, e no âmbito coletivo, ajudar a desenvolver maior conhecimento sobre familiares de primeiro grau de pacientes com Transtorno de Humor Bipolar.

Quais são os direitos dos participantes?

Seus dados serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados desse estudo poderão ser enviados para publicação em um jornal científico, mas você não será identificado por nome.

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 31 / JAN / 2011
 100503 TRV

Sua participação na pesquisa não significa que você será acompanhado em programa de ambulatório desta instituição. Em caso de necessidade de atendimento médico, o participante será encaminhado à Unidade Básica de Saúde mais próxima a sua casa ou, tratando-se de emergência psiquiátrica, ao Posto da Cruzeiro do Sul ou ao IAPI ou ao Hospital São Pedro.

Os procedimentos da pesquisa não serão cobrados do participante, e este receberá uma segunda via desse Termo para arquivo em documentos pessoais.

O participante tem direito de desistir da pesquisa a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer tipo de prejuízo.

Quais são os riscos que envolvem este estudo?

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de punção venosa, como mal-estar passageiro e/ou manchas roxas no local. Além disso, você poderá sentir-se desconfortável ao responder o questionário proposto, pois no mesmo constam perguntas relativas à sua vida pessoal.

Quais são as responsabilidades dos participantes?

Os participantes desse estudo comprometem-se a responder os questionários sem omitir informações.

Declaro que:

1. Concordo voluntariamente em fazer parte desse estudo. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento. Concordo em liberar as informações dos meus registros médicos sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.

Nome do paciente: _____

Assinatura do Paciente

Data: (/ /)

Nome do responsável legal (se aplicado): _____

Assinatura do Responsável

Data: (/ /)

Assinatura do pesquisador

Data: (/ /)

HCPA / GPE
VERSÃO APROVADA
31 JAN / 2014
100503 THV