



FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ALTERAÇÕES NA VIA INTRACELULAR DO FOSFOINOSITOL – IMPLICAÇÕES
PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR E MECANISMO DE
AÇÃO DO LÍTIO**

JAIR C. SOARES

Tese de Doutorado

2004



FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ALTERAÇÕES NA VIA INTRACELULAR DO FOSFOINOSITOL – IMPLICAÇÕES
PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR E MECANISMO DE
AÇÃO DO LÍTIO**

JAIR C. SOARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, através de defesa direta da tese.

Tese de Doutorado

2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito aos mestres e amigos que me orientaram e estimularam para que completássemos os estudos descritos nesta tese:

- Ao Professor Alan Mallinger, da Universidade de Pittsburgh, que foi quem nos introduziu a esta área de pesquisa, e em cujo laboratório aprendemos os métodos utilizados nos estudos aqui descritos.
- Aos Professores Samuel Gershon, Ellen Frank e David J. Kupfer, também da Universidade de Pittsburgh, que nos deram acesso à infra-estrutura necessária e pacientes que recrutamos para estes estudos, e sempre foram fonte incomensurável de estímulo e apoio.
- Ao Professor Husseini Manji, pelo apoio com uma parte dos estudos aqui relatados (ensaios com PKC).
- Ao Professor Valentim Gentil, que desde meus tempos como médico residente em Psiquiatria na Universidade de São Paulo sempre nos estimulou a procurar caminhos ainda não explorados, cuja amizade continua a crescer durante os anos.
- Ao Professor Arthur Guerra de Andrade, da Universidade de São Paulo, que foi meu primeiro modelo e mentor quando eu ainda era acadêmico de

medicina, durante minha iniciação científica, cujo estímulo e ajuda tiveram papel fundamental na minha trajetória.

- Ao Dr. Benício Frey, pela ajuda inestimável com comentários e edição do texto em versões preliminares desta tese.

- Ao amigo Prof. Flávio Kapczinski, cuja colaboração em nossos estudos atuais, orientação e estímulo para que completássemos esta tese de doutoramento foram fundamentais.

- Por fim, agradeço aos meus pais (Geraldo e Hilda), esposa (Hiroko) e filhos (Isabella, Thomas, Eric, Daniel) pelo estímulo contínuo e por “tolerarem” as minhas longas horas no trabalho e ausências repetidas relacionadas com os estudos, viagens e carreira científica.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	7
INTRODUÇÃO.....	9
REFERÊNCIAS.....	20
ARTIGOS EM INGLÊS.....	25
a. Increased platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-biphosphate in drug-free depressed bipolar patients.....	25
b. Effects of lithium on platelet membrane phosphoinositides in bipolar disorder patients: a pilot study.....	28
c. Concurrent measures of protein kinase C and phosphoinositides in lithium-treated bipolar patients and healthy individuals: a preliminary study.....	33
VERSÃO EM PORTUGUÊS DOS ARTIGOS.....	43
a. Aumento dos níveis plaquetários de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP ₂) em pacientes bipolares deprimidos não medicados.....	43
b. Efeitos do lítio nos níveis de fosfoinositóis de membrana plaquetária em pacientes bipolares: um estudo piloto.....	56
c. Medidas concomitantes de proteína quinase C e fosfoinositóis em pacientes bipolares tratados com lítio e voluntários normais: um estudo preliminar.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figuras da Introdução:

FIGURA 1 – Esta figura ilustra os passos principais da via intracelular do fosfoinositol (PI). O lítio bloqueia a conversão do inositol monofosfato (IP) para inositol através da inibição da enzima inositol monofosfatase. P=fósforo, PI= fosfoinositol, PIP=fosfoinositol-4-fosfato, PIP₂=fosfoinositol-4,5-bifosfato, IP₂= inositol bifosfato, IP₃=inositol trifosfato, DAG=diacilglicerol, PKC=proteína quinase C.

RESUMO

Uma possível disfunção nos processos intracelulares de transdução de sinais pode estar implicada na fisiopatologia do transtorno bipolar (Soares and Mallinger 2000). Particularmente, a via intracelular do fosfoinositol (PI) pode ser um sitio de disfunção (Soares et al 1997b). Plaquetas, células periféricas, e amostras de cérebro pós-mortem têm sido utilizados como modelos em estudos prévios com o objetivo de investigar esta hipótese. Os achados que emergem destes estudos são consistentes com a hipótese de uma hiperatividade na via do PI na fase maníaca, que pode estar relacionada com a fase do transtorno.

Nesta tese de doutoramento está descrita uma série de estudos preliminares que utilizaram um modelo plaquetário para estudar alterações da via do PI em pacientes com transtorno afetivo bipolar, e também em relação ao mecanismo de ação do carbonato de lítio. Utilizando um método para quantificação de fosfoinositois em membrana plaquetária desenvolvido pelo Professor Alan Mallinger e colaboradores na Universidade de Pittsburgh, o passo inicial envolveu o estudo da reprodutibilidade teste/reteste do mesmo, que foi documentada como estando dentro de limites aceitáveis (Soares et al 1999a). Subseqüentemente, conduzimos um estudo preliminar em pacientes bipolares já tratados com monoterapia com o lítio (Soares et al 1999b). Nestes pacientes, além de estudarmos os níveis de fosfolipídios de membrana comparados com voluntários normais, também estudamos, em colaboração com o Professor Husseini Manji e colaboradores do National Institute of Mental Health (NIMH), EUA, os níveis de subespécies específicas de PKC em plaquetas de pacientes bipolares (Soares et al 2000a). Nossos achados principais destes estudos colaborativos sugerem uma redução dos níveis plaquetários de PIP_2 , concomitantemente com redução seletiva de subespécies específicas de PKC. Como um passo adicional, também estudamos os

níveis de fosfoinosítois de membrana em indivíduos bipolares na fase depressiva, quando não medicados, que estavam significativamente elevados comparados com voluntários normais (Soares et al 2001). Por último, conduzimos um ensaio clínico aberto com carbonato de lítio em doses terapêuticas em um grupo pequeno de pacientes bipolares, que sugeriu uma diminuição significativa dos níveis de PIP_2 após o tratamento (Soares et al 2000b).

Estes estudos documentam uma disfunção na via do PI em plaquetas de pacientes bipolares, possivelmente modulada pelo tratamento com o lítio, sugerindo o envolvimento desta via na fisiopatologia do transtorno e no mecanismo de ação do lítio. Não se sabe se tais alterações plaquetárias refletem o que se passa nesta via em neurônios humanos *in vivo*, o que constitui uma limitação importante, em potencial, desta abordagem. No entanto, na falta de metodologia de neuroimagem que permita o estudo destas vias no cérebro de pacientes vivos, o modelo periférico plaquetário é de valia para se começar a fazer inferências sobre o funcionamento desta via em pacientes bipolares. Estudos futuros com amostras maiores de pacientes que possam segui-los em fases diferentes do transtorno e tentar determinar correlações entre alterações nesta via produzidas pelo lítio e os efeitos terapêuticos desta medicação serão de grande valia.

INTRODUÇÃO

As vias intracelulares de transdução de sinais podem estar disfuncionais em pacientes com transtorno afetivo bipolar (Hudson et al 1993; Jope et al 1996; Lachman and Papolos 1989; Lenox and Watson 1994; Schreiber and Avissar 1991; Snyder 1992; Soares and Mallinger 1996; Soares and Mallinger 1997; Soares and Mallinger 2000). Anormalidades nos processos de transdução de sinais nos neurônios de regiões cerebrais límbicas e para-límbicas podem estar envolvidas na fisiopatologia do transtorno. Lítio e outros estabilizadores de humor, que são eficazes no tratamento deste transtorno, têm efeitos em passos diferentes destas vias intracelulares de transdução de sinais, que podem ser críticos nos mecanismos de ação dos mesmos (Baraban et al 1989; Manji and Lenox 1994; Manji and Lenox 1999; Manji and Lenox 2000; Manji et al 1995; Mork et al 1992).

Em particular, a via do fosfoinositol (PI) tem sido examinada como um sítio possível de disfunção no transtorno bipolar (Jope et al 1996; Soares and Mallinger 1996; Soares and Mallinger 1997). O fato de que o lítio inibe a enzima inositol monofosfatase (Hokin and Dixon 1993), que é putativamente importante no mecanismo de ação desta medicação, encorajou pesquisas clínicas sobre o funcionamento da via do PI *in vivo* em pacientes bipolares. Uma disfunção primária na via intracelular de transdução de sinais do PI poderia potencialmente estar implicada na fisiopatologia do transtorno bipolar.

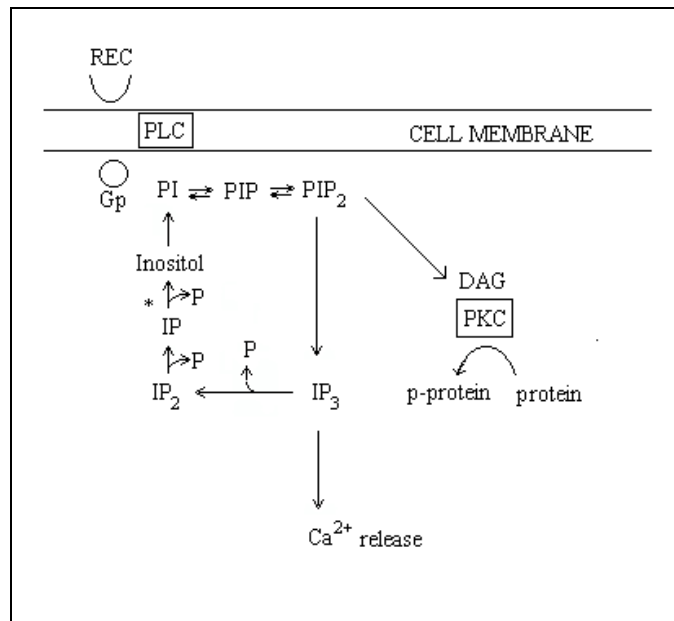


FIGURA 1 – Esta figura ilustra os passos principais da via intracelular to fosfoinositol (PI). O lítio bloqueia a conversão do inositol monofosfato (IP) para inositol através da inibição da enzima inositol monofosfatase. P=fósforo, PI= fosfoinositol, PIP=fosfoinositol-4-fosfato, PIP₂=fosfoinositol-4,5-bifosfato, IP₂= inositol bifosfato, IP₃=inositol trifosfato, DAG=diacilglicerol, PKC=proteína quinase C.

A administração de lítio, por inibir a enzima intracelular inositol monofosfatase (IMPase), limita a quebra dos fosfolipídios inositois estimulada por agonistas desta via, resultando em depleção do inositol livre nos neurônios cerebrais e uma diminuição na habilidade dos mesmos para originar segundos mensageiros (Belmaker et al 1996). Berridge e colaboradores (Berridge et al 1989) postularam que a ação terapêutica do lítio em pacientes bipolares resulta da depleção do inositol intracelular e dos polifosfoinositois em vias hiperativas.

Esta tese relata uma serie de estudos preliminares conduzidos para examinar a hipótese de disfunção na via do PI no transtorno bipolar, utilizando um modelo plaquetário. Nossas

hipóteses foram: 1) pacientes bipolares não medicados teriam anormalidades detectáveis na via intracelular do PI. 2) Tratamento com carbonato de lítio em doses terapêuticas modularia intermediários da via do PI e PKC.

Inositol intracelular e inositol monofosfatase

Os níveis de inositol intracelular parecem estar normais em pacientes bipolares não medicados (Banks et al 1990; Mori et al 1991). No entanto, incorporação de inositol nos “pools” intracelulares de PI em células de linhagem linfoblastóide de pacientes bipolares parece diminuída (Banks et al 1990). Em espécimes pós-mortem, níveis de inositol significativamente reduzidos foram relatados no córtex pré-frontal de pacientes bipolares comparados com controles normais (Shimon et al 1997). Estes achados podem refletir uma anormalidade primária na via do PI em pacientes bipolares. Mas como estes achados não foram restritos a pacientes bipolares e também estavam presentes em vítimas de suicídio, isto sugere que eles possam refletir uma disfunção serotoninérgica.

A enzima inositol monofosfatase é o passo limitante na reciclagem do inositol na via do PI. A atividade desta enzima no córtex frontal de cérebros de pacientes bipolares pós-mortem parece estar normal (Shimon et al 1997). Demonstrou-se que o lítio diminui a atividade eritrocitária da enzima IMPase em voluntários normais (Agam and Livne 1989) e em pacientes bipolares (Moscovich et al 1990), assim como a atividade da IMPase em líquido cefalorraquidiano em voluntários normais (Molchan et al 1994). Outras medicações efetivas no tratamento do transtorno bipolar também podem ter este mesmo mecanismo de ação. No entanto, um estudo em membranas cerebrais bovinas confirmou a atividade do lítio de inibir a atividade da IMPase, enquanto a carbamazepina estimulou a atividade e o valproato não interferiu com a mesma (Vadnal and Parthasarathy 1995).

Um entendimento melhor do papel da via do PI no transtorno bipolar pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para estes pacientes. A administração oral de inositol foi investigada como um tratamento em potencial para a depressão (Belmaker et al 1995). Um estudo duplo cego controlado demonstrou que a administração oral de inositol melhora os sintomas depressivos em pacientes bipolares e unipolares (Belmaker et al 1995; Levine et al 1995). Há também evidência que sugere que o mesmo seria um tratamento para os efeitos colaterais do lítio, se administrado em doses que antagonizariam os efeitos colaterais, mas que não seriam altas o suficiente para antagonizar as ações terapêuticas (Belmaker et al 1995).

Fosfoinositois de membrana

Um modelo plaquetário tem sido utilizado no nosso laboratório para examinar *in vivo* a hipótese da hiperatividade da via do PI no transtorno bipolar. O conteúdo relativo de fosfoinositois em membrana plaquetária foi medido em estudos preliminares, aonde a metodologia utilizada para as medidas plaquetárias foi validada (Brown et al 1993; Mallinger et al 1993; Soares et al 1997a; Soares et al 1999a). Nossos estudos utilizaram cromatografia de camada fina bidimensional de alta performance, seguida de quantificação com densitometria por laser, para separar 8 classes individuais de fosfolipídios, incluindo PI, fosfoinositol-4-fosfato (PIP), e fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) (Mallinger et al 1993). Nossos estudos preliminares sugeriram que a via do PI estivesse hiperativa no estado maníaco. Medidas significativamente aumentadas de PIP₂ em membranas plaquetárias de 7 pacientes bipolares não medicados no estado maníaco comparados com voluntários normais foram relatadas (Brown et al 1993). Num estudo subsequente, nos relatamos um caso de um paciente cujos níveis de PIP₂ em membrana plaquetária aumentaram com a ciclagem da

eutímia para a fase maníaca, enquanto não medicado, e voltaram a níveis próximos ao normal com o tratamento com o lítio, após remissão dos sintomas (Soares et al 1997a). Subseqüentemente nós analisamos os níveis de PIP₂ em membrana plaquetária em 10 pacientes bipolares eutímicos tratados com lítio por pelo menos um mês, comparado com 11 voluntários normais (Soares et al 1999b). Os pacientes eram significativamente mais velhos que os controles (idade média±d.p.=40.3±9.5 e 31.2±7.8 anos, respectivamente), mas não houve correlação entre idade e as medidas de PIP₂ ou outras medidas de fosfolipídios de membrana (PI and PIP). Os valores de absorbância percentual para o PIP₂ em pacientes e controles foram 0.29±0.08% e 0.39±0.12%, respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa (t=2.35, d.f.=19, p=0.03).

Nós também investigamos a reprodutibilidade teste/reteste das medidas plaquetárias de fosfolipídios de membrana em voluntários normais (n=12) que foram estudados em duas ocasiões diferentes separadas por um intervalo de 3 semanas. Estes indivíduos (7 homens, 5 mulheres) tinham uma média±d.p. para idade de 30.6±8.1 anos (intervalo de 21-45 anos). Os coeficientes de variação médios intra-indivíduo variaram de 3.1% to 18%, e os coeficientes de correlação intraclassa (ICCs) foram 0.41 até 0.68. Estes achados demonstraram uma variabilidade de nível baixa a moderada, com uma confiabilidade moderada para estas medidas plaquetárias durante o período de tempo estudado. Quando este método é aplicado para estudos longitudinais em populações psiquiátricas, esta variabilidade tem que ser considerada na interpretação dos resultados. Estes achados foram previamente publicados em detalhe (Soares et al 1999a).

Proteína quinase C (PKC)

A proteína quinase C (PKC) é uma enzima intracelular importante que é ativada como resultado da produção de diacilglicerol (DAG), que se origina da hidrólise do PIP₂. Os processos mediados pela PKC parecem ser importantes no mecanismo de ação do lítio e talvez possam ter relevância para a fisiopatologia do transtorno bipolar (Manji and Lenox 1994). Hiperatividade de subtipos específicos da PKC podem estar presentes na fase maníaca. Esta anormalidade, se presente, poderia refletir uma hiperatividade da via do PI, devido ao fato que o DAG leva a ativação da PKC. Friedman et al (Friedman et al 1993) relatou aumento da atividade da PKC em plaquetas de pacientes bipolares não medicados na fase maníaca comparados com voluntários normais. Neste estudo, a administração do lítio por até 2 semanas reduziu a atividade plaquetária da PKC. Esta hiperatividade da PKC não parece estar presente em pacientes unipolares deprimidos ou esquizofrênicos crônicos (Friedman et al 1993).

Os efeitos do lítio na atividade de PKC parecem ser bifásicos, com o tratamento agudo facilitando eventos intracelulares mediados por PKC, enquanto tratamento a longo prazo diminui sua atividade (Manji et al 1993; Manji and Lenox 1994).

Em conclusão, há evidência preliminar que sugere aumento da atividade de PKC em pacientes bipolares na fase maníaca. Lítio e outros tratamentos para o transtorno bipolar podem ser efetivos por interferir com eventos intracelulares mediados por PKC.

Funções do Ca²⁺

Anormalidades na regulação intracelular do Ca²⁺ podem estar implicadas na fisiopatologia do transtorno bipolar. Dubovsky et al. (Dubovsky et al 1989; Dubovsky et al 1991; Dubovsky et al 1992a; Dubovsky et al 1992b; Dubovsky et al 1994) relataram aumento dos níveis intracelulares basais de Ca²⁺ em plaquetas e leucócitos de pacientes bipolares não

medicados comparado com voluntários normais, na fase maníaca e na depressiva, mas outros estudos não confirmaram estes achados (Berk et al 1994; Bowden et al 1988; Kusumi et al 1991; Kusumi et al 1992). A captação basal de Ca^{2+} em plaquetas estava normal em pacientes bipolares no estado maníaco (Bowden et al 1988). Berk et al (Berk et al 1994) relataram aumento significativo nos níveis plaquetários intracelulares basais de Ca^{2+} em pacientes bipolares eutímicos comparado com voluntários normais.

A atividade intracelular do Ca^{2+} estimulada por fator ativador plaquetário e pela trombina estava significativamente aumentada em pacientes bipolares maníacos e deprimidos não medicados comparado com pacientes unipolares deprimidos, pacientes bipolares eutímicos medicados ou controles normais (Dubovsky et al 1989; Dubovsky et al 1991; Kusumi et al 1992), mas não em todos os estudos (Eckert et al 1994). A resposta plaquetária estimulada por 5HT estava aumentada em pacientes unipolares e bipolares deprimidos (Eckert et al 1993; Eckert et al 1994; Kusumi et al 1991), e em pacientes bipolares na fase maníaca comparados com voluntários normais (Okamoto et al 1995); estes estudos envolveram amostras de pacientes medicados e não medicados. A resposta do Ca^{2+} intracelular a estimulação com a formilmetionilileucilfenilalanina (fMLP) estava aumentada em neutrófilos de pacientes unipolares e bipolares não medicados nas fases depressivas e eutímicas (van Calker et al 1993), e diminuída nos neutrófilos de pacientes unipolares e bipolares eutímicos tratados com lítio comparado com voluntários normais (Forstner et al 1994).

Em conclusão, há dados que sugerem uma hiperatividade da atividade intracelular do Ca^{2+} em pacientes bipolares, mas que não tem sido uniformemente replicados. Esta hiperatividade da função do Ca^{2+} parece estar presente em várias fases do transtorno, e, portanto, pode ser um traço do mesmo, não relacionado com a fase específica. Estes achados

são consistentes com a hipótese de uma hiperfunção da via do PI, considerando que o inositol trifosfato (IP_3), um produto da hidrólise do PIP_2 , estimula a liberação intracelular do Ca^{2+} .

Achados preliminares com MRS

A Espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS) tem sido utilizada para a investigação de fosfolipídios de membrana e de metabolismo celular em pacientes vivos. 1H MRS permite medidas dos níveis de mio-inositol no cérebro. Pacientes bipolares tratados com o lítio tem um aumento dos níveis de inositol/creatina-fosfocreatina medidos com 1H MRS nos gânglios da base comparado com voluntários normais (Sharma et al 1992). Estudos in vivo com ^{31}P MRS relataram aumento de fosfomonoesters nos lobos frontal e temporal de pacientes bipolares nas fases maníaca e depressiva comparado com voluntários normais, e diminuídos em relação a voluntários normais na fase eutímica (Deicken et al 1994; Deicken et al 1995; Kato et al 1995; Kato et al 1991; Kato et al 1992; Kato et al 1993; Kato et al 1994). Estes resultados são consistentes com aumento do anabolismo de fosfolipídios de membrana nas fases maníaca e depressiva, e pode refletir uma hiperatividade das vias intracelulares de transdução de sinais. Isto é consistente com aumento do anabolismo de fosfolipídios de membrana nas fases maníaca e depressiva, e pode refletir uma hiperatividade das vias intracelulares de transdução de sinais. No entanto, estes estudos envolveram principalmente pacientes medicados, ou pacientes não medicados por períodos muito curtos, e é difícil diferenciar anormalidades primárias relacionadas com o transtorno de efeitos de medicações. Adicionalmente, a ^{31}P MRS ainda tem limitações metodológicas consideráveis, devido a resoluções temporal e espacial pobres, e dificuldades para quantificação, o que limita as conclusões que podem ser obtidas destes estudos (Soares et al 1996). Um estudo pequeno duplo-cego com MRS que envolveu 11 voluntários normais tratados com lítio por 7 dias não

encontrou evidência que sugira alterações *in vivo* nos níveis cerebrais de mio-inositol ou de fosfomonoesters como resultado do tratamento com lítio (Silverstone et al 1996). Moore et al (Moore et al 1999) relataram diminuição dos níveis de mio-inositol em córtex pré-frontal relacionado com tratamento com lítio em pacientes bipolares, já detectável depois de uma semana de tratamento. Davanzo et al. (Davanzo et al 2001), num grupo de crianças e adolescentes com transtorno bipolar, encontrou redução dos níveis de mio-inositol/creatina-fosfocreatina no cíngulo anterior após tratamento com lítio.

Tentativas de se desenvolver métodos de neuroimagem para estudos *in vivo* de vias intracelulares de transdução de sinais estão em andamento, e tais esforços podem resultar em novas abordagens para o estudo destes processos no cérebro de pacientes vivos. A função de PKC (Ohmori et al 1993), ciclo do PI (Imahori et al 1992), e incorporação de ácidos graxos em membranas neuronais (Robinson et al 1992) podem ser processos adequados para estudos de imagem com tomografia por emissão de pósitrons (PET), se os traçadores adequados para uso em investigações com pacientes puderem ser desenvolvidos.

Principais achados

Os estudos aqui descritos relatam evidência de uma hiperatividade na via do PI em pacientes bipolares, presente nas fases maníaca e possivelmente na depressiva. Adicionalmente, nossos estudos fornecem evidência de que o lítio modula estas vias intracelulares *in vivo*. Alterações na via do PI podem refletir uma disfunção primária nos mecanismos de neurotransmissão pós-receptores de relevância para a fisiopatologia do transtorno, que pode ser um traço do mesmo ou um fenômeno relacionado com a fase específica. Anormalidades genéticas na expressão de genes associados com as vias intracelulares de transdução de sinais poderiam eventualmente conferir uma vulnerabilidade

para este transtorno. Caso anormalidades nos processos intracelulares de transdução de sinais sejam relacionadas com o transtorno bipolar, será importante determinar se estas anormalidades são primariamente relacionadas com o transtorno, ou com características que são comuns a outros transtornos neuropsiquiátricos. A relevância clínica de uma possível hiperatividade da via do PI para a fisiopatologia do transtorno precisará ser determinada.

Os estudos aqui discutidos utilizaram células sanguíneas periféricas, plaquetas, e amostras de tecido pós-mortem. Alguns poucos estudos preliminares envolveram MRS. Plaquetas e leucócitos, por terem algumas similaridades fisiológicas com células neuronais, no que diz respeito a sistemas neuroquímicos específicos, têm sido utilizadas em pesquisa neuropsicofarmacológica humana (Ebstein et al 1986; Pletscher 1986). Há limitações consideráveis com esta abordagem, mas com metodologia disponível até este momento, a alternativa seriam estudos cerebrais pós-mortem, que também tem limitações significativas (Palmer et al 1988). Nos não podemos estabelecer com certeza se as alterações relatadas em amostras pós-mortem resultaram do tratamento com o lítio ou outra medicação, ou foram alterações que aconteceram depois da morte, e se estas refletem os processos *in vivo* no cérebro. Em relação aos modelos periféricos, também não sabemos se as alterações refletem os processos *in vivo* em neurônios cerebrais. Tem-se ainda que determinar se estes são modelos validos para o estudo de processos cerebrais *in vivo* de transdução de sinais. Desenvolvimentos em MRS e outras técnicas de neuroimagem podem tornar possível o estudo *in vivo* do metabolismo de fosfolipídios cerebrais e dos processos intracelulares de transdução de sinais no cérebro, fornecendo métodos diretos para se estudar os mesmos no cérebro humano intacto.

A ausência de um modelo animal satisfatório para o estudo do transtorno bipolar é um impedimento importante para avanços no entendimento da sua fisiopatologia e para o

desenvolvimento de novos tratamentos. Apesar de esforços nesta área, modelos adequados ainda não estão disponíveis (Machado-Vieira et al 2004).

A hipótese de um defeito genético nos genes que determinam mecanismos das vias intracelulares de transdução de sinais é muito atraente do ponto de vista teórico (Lachman and Papolos 1989; Lachman and Papolos 1995), com achados promissores em alguns estudos (Saito et al 2003; Stopkova et al 2003), mas carece de suporte empírico definitivo até o momento (Gejman et al 1993; Le et al 1994; Ram et al 1997). Estudos futuros nesta área serão facilitados por desenvolvimentos recentes nas metodologias para estudos genéticos e pelo projeto do genoma humano.

Há sugestões de que, na ausência de métodos para se estudar os processos intracelulares de transdução de sinais em pacientes vivos, uma abordagem mais proveitosa para o estudo da fisiopatologia do transtorno bipolar poderia ser o uso de ferramentas da neuropsicofarmacologia (Atack 1996; Coyle and Duman 2003). Drogas relativamente específicas para alguns destes processos, como, por exemplo, inibidores da enzima IMPase, poderiam permitir investigação da relevância clínica destes processos para a fisiopatologia deste transtorno. Novas drogas que sejam específicas para estes sistemas podem ser desenvolvidas, com potencial para desenvolvimento de tratamentos mais efetivos. O desenvolvimento de novas drogas com propriedades inibidoras da IMPase ou que modulem o catabolismo do inositol monofosfato (Atack 1996), que inibam a enzima mio-inositol-1-fosfato sintetase (MIP synthase) (Agam et al 2002), compostos seletivos que inibam processos mediados por PKC (Bradshaw et al 1993), medicações seletivas para subunidades de proteínas G, ou o desenvolvimento de novos antagonistas de Ca^{2+} são abordagens potenciais que podem resultar em novas estratégias para o tratamento deste transtorno (Sassi and Soares 2001).

REFERÊNCIAS

- Agam G, Livne A (1989): Inositol-1-phosphatase of human erythrocytes is inhibited by therapeutic lithium concentrations. *Psychiatry Research* 27:217-224.
- Agam G, Shamir A, Shaltiel G, Greenberg ML (2002): Myo-inositol-1-phosphate (MIP) synthase: a possible new target for antibipolar drugs. *Bipolar Disord* 4 Suppl 1:15-20.
- Atack JR (1996): Inositol monophosphatase, the putative therapeutic target for lithium. *Brain Res Brain Res Rev* 22:183-90.
- Banks RE, Aiton JF, Cramb G, Naylor GJ (1990): Incorporation of inositol into the phosphoinositides of lymphoblastoid cell lines established from bipolar manic-depressive patients. *Journal of Affective Disorders* 19:1-8.
- Baraban JM, Worley PF, Snyder SH (1989): Second messenger systems and psychoactive drug action: Focus on the phosphoinositide system and lithium. *American Journal of Psychiatry* 146:1251-1260.
- Belmaker RH, Bersudsky Y, Agam G, Levine J, Kofman O (1996): How does lithium work on manic depression? Clinical and psychological correlates of the inositol theory. *Annual Review of Medicine* 47:47-56.
- Belmaker RH, Bersudsky Y, Benjamin J, Agam G, Levine J, Kofman O (1995): Manipulation of inositol-linked second messenger systems as a therapeutic strategy in psychiatry. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 49:67-84.
- Berk M, Bodemer W, van Oudenhove T, Butkow N (1994): Dopamine increases platelet intracellular calcium in bipolar affective disorder and controls. *International Clinical Psychopharmacology* 9:291-293.
- Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR (1989): Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59:411-419.
- Bowden CL, Huang LG, Javors MA, et al (1988): Calcium function in affective disorders and healthy controls. *Biological Psychiatry* 23:367-376.
- Bradshaw D, Hill CH, Nixon JS, Wilkinson SE (1993): Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors. *Agents Actions* 38:135-147.
- Brown AS, Mallinger AG, Renbaum LC (1993): Elevated platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in bipolar mania. *American Journal of Psychiatry* 150:1252-1254.
- Coyle JT, Duman RS (2003): Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 38:157-60.
- Davanzo P, Thomas MA, Yue K, et al (2001): Decreased anterior cingulate myo-inositol/creatine spectroscopy resonance with lithium treatment in children with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 24:359-69.
- Deicken RF, Calabrese G, Merrin EL, et al (1994): ³¹phosphorus magnetic resonance spectroscopy of the frontal and parietal lobes in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 36:503-10.
- Deicken RF, Fein G, Weiner MW (1995): Abnormal frontal lobe phosphorous metabolism in bipolar disorder. *American Journal of Psychiatry* 152:915-918.
- Dubovsky SL, Christiano c, Daniell LC, et al (1989): Increased platelet intracellular calcium concentration in patients with bipolar affective disorders. *Archives of General Psychiatry* 46:632-638.
- Dubovsky SL, Lee C, Christiano J, Murphy J (1991): Elevated platelet intracellular calcium concentration in bipolar depression. *Biological Psychiatry* 29:441-450.

- Dubovsky SL, Murphy J, Christiano J, Lee C (1992a): The calcium second messenger system in bipolar disorders: data supporting new research directions. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 4:3-14.
- Dubovsky SL, Murphy J, Thomas M, Rademacher J (1992b): Abnormal intracellular calcium ion concentration in platelets and lymphocytes of bipolar patients. *American Journal of Psychiatry* 149:118-120.
- Dubovsky SL, Thomas M, Hijazi A, Murphy J (1994): Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. *European Archives of Psychiatry & Clinical Neuroscience* 243:229-234.
- Ebstein RP, Lerer B, Bennett ER, et al (1986): Second messenger function in lymphocytes and platelets: a comparison of peripheral and central mechanisms. *Clinical Neuropharmacology* 9:350-352.
- Eckert A, Gann H, Riemann D, Aldenhoff J, Muller WE (1993): Elevated intracellular calcium levels after 5HT₂ receptor stimulation in platelets of depressed patients. *Biological Psychiatry* 34:565-568.
- Eckert A, Gann H, Riemann D, Aldenhoff J, Muller WE (1994): Platelet and lymphocyte free intracellular calcium in affective disorders. *European Archives of Psychiatry & Clinical Neuroscience* 243:235-239.
- Forstner U, Bohus M, Gebicke-Harter PJ, Baumer B, Berger M, van Calker D (1994): Decreased agonist-stimulated Ca²⁺ response in neutrophils from patients under chronic lithium therapy. *European Archives of Psychiatry & Clinical Neuroscience* 243:240-243.
- Friedman E, Hoau-Yan-Wang, Levinson D, Connell TA, Singh H (1993): Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biological Psychiatry* 33:520-525.
- Gejman PV, Martinez M, Cao QH, et al (1993): Linkage analysis of 57 microsatellite loci to bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 9:31-40.
- Hokin LE, Dixon JF (1993): The phosphoinositide signalling system. I. Historical background. II. Effects of lithium on the accumulation of second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate in brain cortex slices. *Prog Brain Res* 98:309-15.
- Hudson CJ, Young LT, Li PP, Warsh JJ (1993): CNS signal transduction in the pathophysiology and pharmacotherapy of affective disorders and schizophrenia. *Synapse* 13:278-293.
- Imahori Y, Fujii R, Ueda S, et al (1992): Membrane trapping of carbon-11-labeled 1,2-diacylglycerols as a basic concept for assessing phosphatidylinositol turnover in neurotransmission process. *Journal of Nuclear Medicine* 33:413-422.
- Jope RS, Song L, Li PP, et al (1996): The phosphoinositide signal transduction system is impaired in bipolar affective disorder brain. *Journal of Neurochemistry* 66:2402-2409.
- Kato T, Shioiri T, Murashita J, et al (1995): Lateralized abnormality of high energy phosphate metabolism in the frontal lobes of patients with bipolar disorder detected by phase-encoded 31P-MRS. *Psychological Medicine* 25:557-566.
- Kato T, Shioiri T, Takahashi S, Inubushi T (1991): Measurement of brain phosphoinositide metabolism in bipolar patients using in vivo 31P-MRS. *Journal of Affective Disorders* 22:185-190.
- Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Inubushi T (1992): Brain phosphorous metabolism in depressive disorders detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Affective Disorders* 26:223-230.

- Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Inubushi T (1993): Alterations in brain phosphorous metabolism in bipolar disorder detected by in vivo ^{31}P and ^7Li magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Affective Disorders* 27:53-59.
- Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Murashita J, Hamakawa H, Inubushi T (1994): Reduction of brain phosphocreatine in bipolar II disorder detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Affective Disorders* 31:125-133.
- Kusumi I, Koyama T, Yamashita I (1991): Serotonin-stimulated Ca^{2+} response is increased in the blood platelets of depressed patients. *Biological Psychiatry* 30:311-312.
- Kusumi I, Koyama T, Yamashita I (1992): Thrombin-induced platelet calcium mobilization is enhanced in bipolar disorders. *Biological Psychiatry* 32:731-734.
- Lachman HM, Papolos DF (1989): Abnormal signal transduction: a hypothetical model for bipolar affective disorder. *Life Sciences* 45:1413-1426.
- Lachman HM, Papolos DF (1995): A molecular model for bipolar affective disorder. *Medical Hypotheses* 45:255-264.
- Le F, Mitchell P, Vivero C, et al (1994): Exclusion of close linkage of bipolar disorder to the Gs-alpha subunit gene in nine australian pedigrees. *Journal of Affective Disorders* 32:187-195.
- Lenox RH, Watson DG (1994): Lithium and the brain: a psychopharmacological strategy to a molecular basis for manic depressive illness. *Clinical Chemistry* 40:309-314.
- Levine J, Barak Y, Gonzalves M, et al (1995): Double-blind, controlled trial of inositol treatment of depression. *American Journal of Psychiatry* 152:792-4.
- Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC (2004): Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:209-24.
- Mallinger AG, Yao JK, Brown AS, Dippold CS (1993): Analysis of complex mixtures of phospholipid classes from cell membranes using two-dimensional thin-layer chromatography and scanning laser densitometry. *Journal of Chromatography* 614:67-75.
- Manji HK, Etcheberrigaray R, Chen G, Olds JL (1993): Lithium decreases membrane-associated protein kinase C in hippocampus: selectivity for the alpha isozyme. *Journal of Neurochemistry* 61:2303-2310.
- Manji HK, Lenox RH (1994): Long-term action of lithium: A role for transcriptional and posttranscriptional factors regulated by protein kinase C. *Synapse* 16:11-28.
- Manji HK, Lenox RH (1999): Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry* 46:1328-51.
- Manji HK, Lenox RH (2000): Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 48:518-30.
- Manji HK, Potter WZ, Lenox RH (1995): Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Archives of General Psychiatry* 52:531-543.
- Molchan SE, Atack JR, Sunderland T (1994): Decreased CSF inositol monophosphatase activity after lithium treatment. *Psychiatry Research* 53:103-105.
- Moore GJ, Bechuk JM, Parrish JK, et al (1999): Temporal dissociation between lithium-induced changes in frontal lobe myo-inositol and clinical response in manic-depressive illness. *Am J Psychiatry* 156:1902-8.
- Mori H, Koyama T, Yamashita I (1991): Platelet alpha-2 adrenergic receptor-mediated phosphoinositide responses in endogenous depression. *Life Sciences* 48:741-748.

- Mork A, Geisler A, Hollund P (1992): Effects of lithium on second messenger systems in the brain. [Review]. *Pharmacology & Toxicology* 71 Suppl 1:4-17.
- Moscovich DG, Belmaker RH, Agam G, Livne A (1990): Inositol-1-phosphatase in red blood cells of manic-depressive patients before and during treatment with lithium. *Biological Psychiatry* 27:552-555.
- Ohmori Y, Imahori Y, Ueda S, et al (1993): Protein kinase C imaging using carbon-11-labeled phorbol 13-isobutyrate-20-[1-11C]butyrate as the potential ligand for positron emission tomography. *Journal of Nuclear Medicine* 34:431-439.
- Okamoto Y, Kagaya A, Shinno H, Motohashi N, Yamawaki S (1995): Serotonin-induced platelet calcium mobilization is enhanced in mania. *Life Sciences* 56:327-332.
- Palmer AM, Lowe SL, Francis PT, Bowen DM (1988): Are post-mortem biochemical studies of human brain worthwhile? *Biochemical Society Transactions* 16.
- Pletscher A (1986): Blood platelets as neuronal models: use and limitations. *Clinical Neuropharmacology* 9:344-346.
- Ram A, Guedj F, Cravchik A, et al (1997): No abnormality in the gene for the G protein stimulatory alpha subunit in patients with bipolar disorder. *Archives of General Psychiatry* 54:44-8.
- Robinson PJ, Noronha J, DeGeorge JJ, Freed LM, Nariai T, Rapoport SI (1992): A quantitative method for measuring regional in vivo fatty-acid incorporation into and turnover within brain phospholipids: review and critical analysis. *Brain Research Reviews* 17:187-214.
- Saito T, Stopkova P, Diaz L, Papolos DF, Boussemart L, Lachman HM (2003): Polymorphism screening of PIK4CA: possible candidate gene for chromosome 22q11-linked psychiatric disorders. *Am J Med Genet* 116B:77-83.
- Sassi RB, Soares JC (2001): Emerging therapeutic targets in bipolar mood disorder. *Expert Opin Ther Targets* 5:587-599.
- Schreiber G, Avissar S (1991): Lithium sensitive G protein hyperfunction: a dynamic model for the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Medical Hypotheses* 35:237-243.
- Sharma R, Venkatasubramanian PN, Barany M, Davis JM (1992): Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in schizophrenic and affective patients. *Schizophrenia Research* 8:43-49.
- Shimon H, Agam G, Belmaker RH, Hyde TM, Kleinman JE (1997): Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 154:1148-50.
- Silverstone PH, Hanstock CC, Fabian J, Staab R, Allen PS (1996): Chronic lithium does not alter human myo-inositol or phosphomonoester concentrations as measured by 1H and 31P MRS. *Biol Psychiatry* 40:235-46.
- Snyder SH (1992): Second messengers and affective illness - Focus on the phosphoinositide cycle. *Pharmacopsychiatry* 25:25-28.
- Soares JC, Chen G, Dippold CS, et al (2000a): Concurrent measures of protein kinase C and phosphoinositides in lithium-treated bipolar patients and healthy individuals: a preliminary study. *Psychiatry Res* 95:109-118.
- Soares JC, Dippold CS, Mallinger AG (1997a): Platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate alterations in bipolar disorder - Evidence from a single case study. *Psychiatry Research* 69:197-202.
- Soares JC, Dippold CS, Mallinger AG (1997b): Platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate alterations in bipolar disorder--evidence from a single case study. *Psychiatry Res* 69:197-202.

- Soares JC, Dippold CS, Wells KF, Frank E, Kupfer DJ, Mallinger AG (2001): Increased platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in drug-free depressed bipolar patients. *Neurosci Lett* 299:150-2.
- Soares JC, Dippold CS, Wells KF, Houck P, Mallinger AG (1999a): Reproducibility of in vivo measures of platelet membrane phospholipids in human subjects. *Psychiatry Res* 86:107-12.
- Soares JC, Krishnan KR, Keshavan MS (1996): Nuclear magnetic resonance spectroscopy: new insights into the pathophysiology of mood disorders. *Depression* 4:14-30.
- Soares JC, Mallinger AG (1996): Abnormal phosphatidylinositol (PI)-signalling in bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 39:461-462.
- Soares JC, Mallinger AG (1997): Intracellular phosphatidylinositol pathway abnormalities in bipolar disorder patients. *Psychopharmacol Bull* 33:685-91.
- Soares JC, Mallinger AG (2000): Intracellular signal transduction dysfunction in bipolar disorder. In Soares JC, Gershon S (eds), *Bipolar Disorder - Basic Mechanisms and Therapeutic Implications*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc., pp 179-200.
- Soares JC, Mallinger AG, Dippold CS, Forster Wells K, Frank E, Kupfer DJ (2000b): Effects of lithium on platelet membrane phosphoinositides in bipolar disorder patients: a pilot study. *Psychopharmacology (Berl)* 149:12-6.
- Soares JC, Mallinger AG, Dippold CS, Frank E, Kupfer DJ (1999b): Platelet membrane phospholipids in euthymic bipolar disorder patients: are they affected by lithium treatment? *Biol Psychiatry* 45:453-7.
- Stopkova P, Saito T, Fann CS, et al (2003): Polymorphism screening of PIP5K2A: a candidate gene for chromosome 10p-linked psychiatric disorders. *Am J Med Genet* 123B:50-8.
- Vadnal R, Parthasarathy R (1995): Myo-inositol monophosphatase: diverse effects of lithium, carbamazepine, and valproate. *Neuropsychopharmacology* 12:277-285.
- van Calker D, Forstner U, Bohus M, et al (1993): Increased sensitivity to agonist stimulation of the Ca²⁺ response in neutrophils of manic-depressive patients: effect of lithium therapy. *Neuropsychobiology* 27:180-183.

AUMENTO DOS NÍVEIS PLAQUETÁRIOS DE FOSFATIDILINOSITOL-4,5-BIFOSFATO (PIP₂) EM PACIENTES BIPOLARES DEPRIMIDOS NÃO MEDICADOS

Jair C. Soares¹, Christine S. Dippold¹, Kelly Forster Wells¹,
Ellen Frank^{1,2}, David J. Kupfer^{1,3}; Alan G. Mallinger^{1,4}

¹Department of Psychiatry, Western Psychiatric Institute and Clinic, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA; ²Department of Psychology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA; ³Department of Neuroscience, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA; ⁴Department of Pharmacology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA.

Publicado em: Neuroscience Letters 299:150-152, 2001

Este trabalho foi realizado com financiamento do NIMH (MH 01736, MH 29618, MH 30915), Theodore and Vada Stanley Foundation, e NARSAD. Estes resultados foram apresentados anteriormente no congresso da Society for Neuroscience, Miami, Flórida, Outubro de 1999.

RESUMO

Investigações anteriores com pacientes bipolares relataram anormalidades no sistema intracelular de segundos mensageiros da via do fosfoinositol. Este estudo foi conduzido para examinar os níveis de intermediários específicos da via do fosfoinositol em pacientes bipolares não medicados quando deprimidos (n=9) e em voluntárias normais (n=19). Os níveis de fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em pacientes bipolares estavam significativamente elevados comparados com os níveis em voluntários normais (0.67±0.14% e 0.44±0.17%, respectivamente; teste t=3.71, d.f.=26, p=0.001). Diferenças significativas entre os níveis de fosfoinositol-4-fosfato (PIP) (0.65±0.17% e 0.58±0.20%, respectivamente; teste t=1.02, d.f.=26, p=0.32) ou fosfoinositol (PI) (5.92±1.23% e 5.56±1.45%, respectivamente; teste t=0.68, d.f.=26, p=0.51) não foram encontradas. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, níveis aumentados de PIP₂ na membrana plaquetária de pacientes bipolares deprimidos, e fornecem evidência adicional de que a via do fosfoinositol é sitio de anormalidades no transtorno bipolar.

Palavras-chave: fosfoinositol, plaquetas, transtorno bipolar, transtornos afetivos, transdução de sinais, segundos mensageiros, fisiopatologia.

O transtorno afetivo bipolar é um transtorno psiquiátrico severo, com uma prevalência estimada de cerca de 1%-1.5% na população geral. Infelizmente, a fisiopatologia deste transtorno não esta ainda esclarecida. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente em pesquisa que tentem identificar os mecanismos neurobiológicos básicos que possam estar envolvidos na causa deste transtorno mental severo [1]. Têm havido sugestões de que anormalidades dos mecanismos intracelulares de transdução de sinais possam estar envolvidas na fisiopatologia deste transtorno [6, 8, 10, 12, 16, 20]. Particularmente, o sistema de mensageiros secundários do fosfoinositol tem sido examinado como um sítio potencial de anormalidades [7, 15]. Devido à impossibilidade de se examinar este sistema de mensageiros secundários no cérebro de pacientes vivos, as pesquisas nesta área tem focalizado primariamente em marcadores periféricos. Particularmente, plaquetas têm sido usadas como um modelo para se estudar mensageiros secundários e sistemas neurotransmissores [4, 13]. O nosso grupo previamente conduziu estudos examinando o conteúdo de fosfoinositois na membrana plaquetária, como uma abordagem para se estudar o funcionamento do sistema de mensageiros secundários do fosfoinositol em pacientes com transtorno bipolar. Depois da demonstração original de um aumento dos níveis de fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) em membrana plaquetária de pacientes maníacos não medicados [2], nós relatamos o caso de um paciente cujos níveis plaquetários de PIP_2 aumentaram durante um episodio maníaco, e subseqüentemente retornaram a níveis normais depois de tratamento com o lítio [14]. Subseqüentemente, nós relatamos níveis plaquetários de PIP_2 reduzidos em pacientes bipolares eutímicos tratados com lítio comparados com voluntários normais [18], assim como uma diminuição dos níveis de PIP_2 depois de 3 semanas de tratamento com lítio em doses terapêuticas em pacientes bipolares que foram estudados antes e depois do tratamento [17]. Relatos de

níveis plaquetários elevados de PIP₂ na fase maníaca, que se normalizam com o tratamento com o lítio, sugerem alterações relacionadas com a fase do transtorno, possivelmente implicadas na fisiopatologia do transtorno bipolar.

Com a intenção de estender esta linha de investigação, nós examinamos se anormalidades nos níveis de fosfoinositois em membrana plaquetária estariam presentes em pacientes bipolares não tratados na fase depressiva. Nossa hipótese era de que os níveis de PIP₂ estariam anormalmente elevados nesta fase do transtorno, sugerindo alterações relacionadas com a fase do mesmo no ciclo intracelular do fosfoinositol em pacientes bipolares.

Nove pacientes não medicados que preencheram o critério diagnóstico para transtorno bipolar do tipo I pelo *DSM-IV (Manual Diagnostico e Estatístico, versão IV)* foram estudados (6 homens, 3 mulheres; media de idade±D.P.=31.7±4.4 anos). Estes pacientes não tinham nenhum problema médico significativo atual, comorbidades psiquiátricas de eixo I, ou historia significativa de abuso ou dependência de substancias. Todos os pacientes estavam na fase depressiva e tinha estado sem receber nenhuma medicação por pelo menos duas semanas (para o lítio, não foram tratados com o mesmo por pelo menos um mês). O diagnóstico de transtorno bipolar pelo DSM-IV foi estabelecido com a Entrevista Clinica Estruturada para o DSM-IV (*SCID-IV*), e foi confirmada numa avaliação clinica conduzida por um medico psiquiatra assistente. Dezenove voluntários normais foram estudados (10 homens, 9 mulheres; media de idade±D.P.= 34.2±9.0 anos). Eles não tinham nenhuma historia pregressa de problemas psiquiátricos, abuso ou dependência de substancias, ou problemas médicos significativos atuais. A entrevista do *SCID-IV*, versão para não-pacientes, foi utilizada para excluir diagnósticos psiquiátricos em eixo I nestes indivíduos. Todos os participantes assinaram

um termo de consentimento para participar no estudo. O protocolo de pesquisa e os termos de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Pittsburgh.

Os fosfoinosítois da membrana plaquetária foram medidos como previamente relatado [9]. Uma amostra de sangue foi obtida de uma veia periférica no intervalo de tempo entre 10:00 e 13:00. Todos os participantes ficaram sentados em uma cadeira por pelo menos 15 minutos antes das amostras de sangue serem coletadas. As amostras de sangue (2 x 34 ml) foram coletadas com uma agulha do tipo “butterfly” de calibre 21, em seringas plásticas contendo 6 ml do anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD) (Sigma Chemical Company, USA). As preparações de membrana plaquetária foram obtidas e estocadas a -80°C . Subseqüentemente, estas preparações foram descongeladas em temperatura ambiente, e uma extração bifásica dos lipídeos foi feita. Os fosfolipídios de membrana foram separados usando cromatografia de camada fina bidimensional (two-dimensional thin-layer chromatography) em placas de alta performance e quantificadas com densitometria a laser (scanning laser densitometry). Os níveis de cada classe de fosfolipídio foram medidos usando um algoritmo que estimou um volume relativo (GelScan XL 2400 Software, versão 2.1, Pharmacia LKB Biotechnology), baseado na área de cada fosfolipídio e na absorvância medida nesta área. Os fosfolipídios foram delineados e quantificados com o software GelScan XL 2400 por um assistente de pesquisa (C.S.D.), que estava cego para a identidade das amostras. Os valores foram expressos com unidades de absorvância versus área ($\text{AU} \times \text{mm}^2$), e a absorvância relativa para cada fosfolipídio foi calculada como uma percentagem da absorvância total para todos os fosfolipídios. A sensibilidade deste método foi previamente determinada como $< 10 \text{ ng}$ [9].

A análise estatística foi conduzida com o software SPSS para Windows, versão 8.0 (SPSS, Inc.). Testes t não pareados individuais foram conduzidos para cada variável dependente para comparações entre pacientes bipolares e voluntários normais.

Os pacientes bipolares deprimidos tiveram níveis significativamente aumentados de PIP₂ em membrana plaquetária comparados com os voluntários normais (0.67±0.14% e 0.44±0.17%, respectivamente; teste t=3.71, d.f.=26, p=0.001). Os dados para cada indivíduo estão ilustrados na figura 1. Não houve nenhuma diferença significativa entre os pacientes bipolares e os voluntários normais em relação aos níveis de PIP (0.65±0.17% e 0.58±0.20%, respectivamente; teste t=1.02, d.f.=26, p=0.32) ou PI (5.92±1.23% e 5.56±1.45%, respectivamente; teste t=0.68, d.f.=26, p=0.51).

Estes resultados constituem a primeira demonstração de níveis plaquetários de PIP₂ aumentados em pacientes bipolares na fase depressiva. Em conjunto com resultados prévios que demonstram níveis aumentados de PIP₂ na fase maníaca do transtorno [2], eles fornecem evidência de que a via de mensageiros secundários do fosfoinositol seja um sítio de anormalidades em pacientes bipolares. Particularmente, nossos resultados sugerem a possibilidade de que uma hiperfunção nesta via relacionada à fase do transtorno possa estar mecanisticamente envolvida com a fisiopatologia dos episódios afetivos neste transtorno. Esta hipótese é também sustentada pelo fato de que estudos prévios conduzidos pelo nosso grupo com administração de lítio, o protótipo dos estabilizadores de humor, para pacientes bipolares resultou em níveis reduzidos de PIP₂ em membrana plaquetária [17, 18].

Considerando achados anteriores de que o tratamento com o lítio reduz os níveis de PIP₂ em membrana plaquetária em pacientes bipolares [17, 18], parece provável que a

elevação dos níveis de PIP₂ relatada no nosso estudo seja uma alteração relacionada com a fase do transtorno. No entanto, estudos futuros que também examinem pacientes bipolares eutímicos serão críticos para continuar a examinar esta hipótese. Devido à extensiva intercomunicação entre várias vias de transdução intracelular de sinais (para uma revisão, veja Manji et al. [10]), a interpretação fisiológica dos níveis aumentados de PIP₂ não está clara. Eles podem representar um estado de hiperatividade na via do fosfoinositol. Caso esta hipótese seja correta, estes achados estariam de acordo com relatos de aumento da liberação intracelular de Ca²⁺ em pacientes bipolar em várias fases do transtorno [3], assim como achados de aumento da atividade da *proteína kinase C (PKC)* em pacientes deprimidos e maníacos [5, 19]. Estudos que examinem concomitantemente passos diferentes destas vias intracelulares nos mesmos indivíduos serão necessários para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos *in vivo* envolvidos neste transtorno. Adicionalmente, estudos em pacientes unipolares deprimidos serão importantes para se determinar a especificidade destes achados, particularmente relacionados com achados recentes de Pandey et al [11] que sugerem anormalidades nos mecanismos mediados por PKC em pacientes unipolares deprimidos.

Uma limitação presente na nossa abordagem se origina do fato que não é sabido se alterações em membrana plaquetária refletem alterações no cérebro de pacientes vivos nestas mesmas vias. No entanto, trabalhos anteriores na área de neuropsicofarmacologia clínica sugerem que as plaquetas sejam modelos aceitáveis de processos neuronais específicos [4, 13]. À medida em que novos métodos *in vivo* para se examinar diretamente a neuroquímica do cérebro humano se tornarem disponíveis, e tornarem o estudo de processos intracelulares de transdução de sinais possível em pacientes vivos, é esperado que estas linhas promissoras de investigação continuem a avançar e

eventualmente resultem em progresso substancial para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste transtorno mental severo.

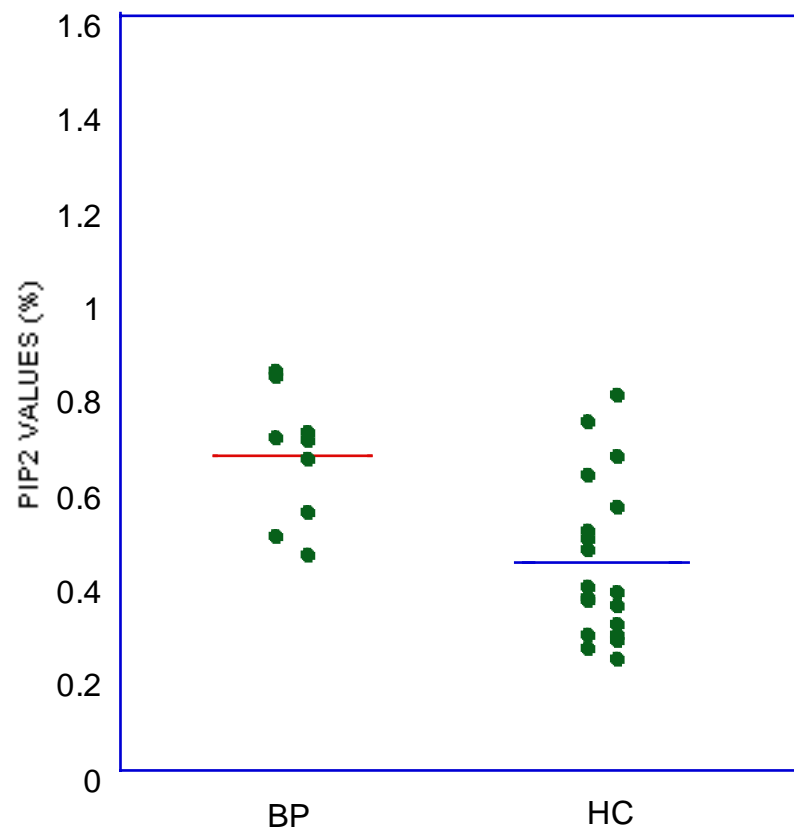
Em conclusão, nós encontramos níveis elevados de PIP_2 em plaquetas de pacientes bipolares deprimidos não-medicados. Estes achados podem representar uma hiperatividade no sistema de segundos mensageiros da via do fosfoinositol, de possível relevância para a fisiopatologia do transtorno bipolar. Estudos futuros serão necessários para replicar independentemente estes achados e esclarecer se estas anormalidades são relacionadas com a fase ou constituem um traço presente no transtorno, e se as mesmas se correlacionam com a resposta terapêutica ou evolução do transtorno.

- [1] Baldessarini, R.J., Commentary - A plea for integrity of the bipolar disorder concept, *Bipolar Disorders*, 2 (2000) 3-7.
- [2] Brown, A.S., Mallinger, A.G. and Renbaum, L.C., Elevated platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in bipolar mania, *American Journal of Psychiatry*, 150 (1993) 1252-1254.
- [3] Dubovsky, S.L., Murphy, J., Christiano, J. and Lee, C., The calcium second messenger system in bipolar disorders: data supporting new research directions, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 4 (1992) 3-14.
- [4] Ebstein, R.P., Lerer, B., Bennett, E.R., Dayek, D.B., Newman, M.E., Shapira, B. and Kindler, S., Second messenger function in lymphocytes and platelets: a comparison of peripheral and central mechanisms, *Clinical Neuropharmacology*, 9 (1986) 350-352.
- [5] Friedman, E., Hoau-Yan-Wang, Levinson, D., Connell, T.A. and Singh, H., Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode, *Biological Psychiatry*, 33 (1993) 520-525.
- [6] Hahn, C.G. and Friedman, E., Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder, *Bipolar Disorders*, 2 (2000) 81-86.
- [7] Jope, R.S., Song, L., Li, P.P., Young, L.T., Kish, S.J., Pacheco, M.A. and Warsh, J.J., The phosphoinositide signal transduction system is impaired in bipolar affective disorder brain., *Journal of Neurochemistry*, 66 (1996) 2402-2409.
- [8] Lachman, H.M. and Papolos, D.F., Abnormal signal transduction: a hypothetical model for bipolar affective disorder, *Life Sciences*, 45 (1989) 1413-1426.

- [9] Mallinger, A.G., Yao, J.K., Brown, A.S. and Dippold, C.S., Analysis of complex mixtures of phospholipid classes from cell membranes using two-dimensional thin-layer chromatography and scanning laser densitometry, *Journal of Chromatography*, 614 (1993) 67-75.
- [10] Manji, H.K., Potter, W.Z. and Lenox, R.H., Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Archives of General Psychiatry*, 52 (1995) 531-543.
- [11] Pandey, G.N., Dwivedi, Y., Kumari, R. and Janicak, P.G., Protein kinase C in platelets of depressed patients, *Biol Psychiatry*, 44 (1998) 909-11.
- [12] Perez, J., Tardito, D., Mori, S., Racagni, G., Smeraldi, E. and Zanardi, R., Abnormalities of cAMP signaling in affective disorders: implications for pathophysiology and treatment, *Bipolar Disorders*, 2 (2000) 27-36.
- [13] Pletscher, A., Blood platelets as neuronal models: use and limitations, *Clinical Neuropharmacology*, 9 (1986) 344-346.
- [14] Soares, J.C., Dippold, C.S. and Mallinger, A.G., Platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate alterations in bipolar disorder - Evidence from a single case study, *Psychiatry Research*, 69 (1997) 197-202.
- [15] Soares, J.C. and Mallinger, A.G., Intracellular phosphatidylinositol pathway abnormalities in bipolar disorder patients, *Psychopharmacol Bull*, 33 (1997) 685-91.
- [16] Soares, J.C. and Mallinger, A.G., Intracellular signal transduction dysfunction in bipolar disorder. In J.C. Soares and S. Gershon (Eds.), *Bipolar Disorder - Basic Mechanisms and Therapeutic Implications*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000, pp. 179-200.

- [17] Soares, J.C., Mallinger, A.G., Dippold, C.S., Forster Wells, K., Frank, E. and Kupfer, D.J., Effects of lithium on platelet membrane phosphoinositides in bipolar disorder patients: a pilot study, *Psychopharmacology (Berl)*, 149 (2000) 12-6.
- [18] Soares, J.C., Mallinger, A.G., Dippold, C.S., Frank, E. and Kupfer, D.J., Platelet membrane phospholipids in euthymic bipolar disorder patients: are they affected by lithium treatment?, *Biol Psychiatry*, 45 (1999) 453-7.
- [19] Wang, H.Y., Markowitz, P., Levinson, D., Undie, A.S. and Friedman, E., Increased membrane-associated protein kinase C activity and translocation in blood platelets from bipolar affective disorder patients, *J Psychiatr Res*, 33 (1999) 171-9.
- [20] Warsh, J.J. and Li, P.P., Second Messenger Systems and Mood Disorders, *Current Opinion in Psychiatry*, 9 (1996) 23-29.

FIGURA 1 – NÍVEIS DE PIP2 NA MEMBRANA PLAQUETÁRIA



LEGENDA - FIGURA 1

Os níveis médios de fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) em membrana plaquetária *estão significativamente aumentados em pacientes bipolares não-tratados na fase depressiva comparado com voluntários normais* ($0.67 \pm 0.14\%$ e $0.44 \pm 0.17\%$, *respectivamente; teste $t=3.71$, $d.f.=26$, $p=0.001$*). BP= pacientes bipolares, HC= voluntários normais.

**EFEITOS DO LÍTIO NOS NÍVEIS DE FOSFOINOSITOIS DE MEMBRANA
PLAQUETÁRIA EM PACIENTES BIPOLARES: UM ESTUDO PILOTO**

Jair C. Soares, M.D.¹, Alan G. Mallinger, M.D.^{1,2}, Christine S. Dippold, B.S.¹,

Kelly Forster Wells, L.S.W.¹, Ellen Frank, Ph.D.^{1,3}, David J. Kupfer, M.D.^{1,4}

¹Department of Psychiatry, Western Psychiatric Institute and Clinic, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA; ²Department of Pharmacology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA; ³Department of Psychology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA; ⁴Department of Neuroscience, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA.

Publicado em: Psychopharmacology 149:12-16, 2000

RESUMO

Racional: Estudos animais *in vitro* e *in vivo* sugerem que a via intracelular do fosfoinositol (PI) seja um alvo importante para os efeitos do lítio. Objetivos: Nós conduzimos um estudo preliminar para examinar os efeitos *in vivo* do tratamento com o lítio em fosfoinositois em membrana plaquetária, na tentativa de continuar a examinar a hipótese de que o lítio tenha efeitos significativos *in vivo* na via do fosfoinositol nestes pacientes. Métodos: Nós quantificamos fosfoinositol (PI), fosfoinositol-4-fosfato (PIP), e fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em membrana plaquetária de 7 pacientes bipolares (5 M, 2 F; idade média=27.9±5.7 anos), inicialmente enquanto não-medicados e subsequentemente depois de pelo menos 21 dias de tratamento com o lítio (média±D.P.=28.7±7.1 dias). Resultados: Os valores médios±D7.P. para PI foram 5.63±2.25% e 5.21±1.06%; PIP foram 0.68±0.20% e 0.55±0.11%; e PIP₂ foram 0.60±0.21% e 0.38±0.15%, antes e depois do tratamento com o lítio, respectivamente. A diminuição nos níveis de PIP₂ depois do tratamento com o lítio foi estatisticamente significativa (Wilcoxon Signed Ranks Test, Z=-2.37, p=0.02). Conclusão: Este estudo longitudinal sugere que as doses terapêuticas de lítio diminuam significativamente os níveis de PIP₂ em membrana plaquetária *in vivo* em pacientes bipolares, o que pode refletir mecanismos relevantes de ação do lítio no transtorno bipolar.

Palavras-chave: lítio, fosfoinositois, plaquetas, transtorno bipolar, transdução de sinais, mecanismo de ação

INTRODUÇÃO

O transtorno bipolar (doença maníaco-depressiva) aflige cerca de 1% da população mundial, causando sofrimento e limitações consideráveis. O lítio, a medicação mais efetiva e amplamente utilizada para este transtorno, é útil em cerca de 60% dos casos (Gershon and Soares 1997; Schou 1997). Pesquisas em relação aos mecanismos de ação do lítio têm sido conduzidas já por muitos anos, mas ainda não se sabe o que o faz eficaz para o tratamento deste transtorno. O entendimento dos mecanismos de ação do lítio pode contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia do transtorno bipolar, e pode ser crítico para desenvolvimentos terapêuticos futuros nesta área (Soares and Gershon 1998).

Anormalidades nas vias intracelulares de transdução de sinais podem estar implicadas na fisiopatologia do transtorno bipolar (Lachman and Papolos 1989; Manji et al. 1995b; Soares and Mallinger 1997; Wachtel 1989). Aumento na função de subtipos específicos de proteínas G (alfa,s) em cérebros de pacientes pós-mortem e em leucócitos (Manji et al. 1995a; Young et al. 1991), e aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em repouso, assim como aumento da reatividade do Ca^{2+} em plaquetas, leucócitos, e linfoblastos transformados têm sido relatados em pacientes bipolares (Dubovsky et al. 1992; Eckert et al. 1994; Kusumi et al. 1992) . A via do fosfoinositol (PI) tem também sido examinada como um possível sitio de disfunção, com achados preliminares que indicam anormalidades (Belmaker et al. 1995; Jope et al. 1996; Snyder 1992; Soares and Mallinger 1996; Soares e Mallinger 1997). Adicionalmente, uma hiperatividade da proteína quinase C pode também estar presente no estado maníaco (Friedman et al. 1993). Os achados de aumento dos níveis intracelulares Ca^{2+} em repouso e aumento da reatividade do Ca^{2+} , assim como aumento da função de PKC, poderiam ser consistentes com uma hiperatividade da via do PI.

Sabe-se que o lítio tem ações *in vitro* e *in vivo* importantes no ciclo do PI (Baraban et al. 1989; Belmaker et al. 1996; Berridge et al. 1989; Lenox and Watson 1994; Manji et al. 1995b; Snyder 1992; Vadnal and Parthasarathy 1995). Estudos clínicos preliminares têm relatado efeitos significativos na reatividade do Ca^{2+} intracelular (Dubovsky et al. 1992; Forstner et al. 1994), função de proteína G (Drummond 1988; Manji et al. 1995a), e função de PKC (Friedman et al. 1993; Manji et al. 1995b). De maneira importante, estudos humanos têm também demonstrado que o lítio pode inibir a enzima inositol monofosfatase (IMPase) (Agam and Livne 1989; Molchan et al. 1994; Moscovich et al. 1990).

Não há nenhum estudo humano *in vivo* que tenha demonstrado diretamente, até o momento, que o tratamento com o lítio em concentrações terapêuticas afete significativamente o conteúdo de fosfoinosítois em membrana. Como uma maneira de examinar os efeitos do lítio nestes processos em voluntários humanos, e para examinar a relevância da via do PI na fisiopatologia do transtorno bipolar, nosso laboratório tem conduzido estudos em pacientes bipolares não medicados e em pacientes tratados com o lítio. Na ausência de método satisfatório para examinar diretamente os vários intermediários da via do PI no cérebro humano *in vivo*, nós utilizamos plaquetas como um modelo para determinar o conteúdo relativo de fosfoinosítois na membrana. No nosso primeiro relato, 7 pacientes maníacos não medicados tinham níveis significativamente aumentados de PIP_2 na membrana plaquetária comparado com 7 voluntários normais (Brown et al. 1993), o que sugeriu uma hiperatividade da via do PI no estado maníaco. Em um relato de caso (Soares et al. 1997) de um paciente que tinha sido seguido por vários meses em varias fases do transtorno, houve aumento dos níveis plaquetários de PIP_2 quando a paciente ciclou da eutímia para a mania, e depois do tratamento com o lítio os níveis de PIP_2 diminuíram para valores semelhantes aos da fase eutímica sem medicação. Em outro relato (Soares et al. 1999b), os níveis de PIP_2 na

membrana estavam significativamente reduzidos em uma amostra de 10 pacientes bipolares eutímicos que estavam em tratamento com o lítio por pelo menos 1 mês comparado com 11 voluntários normais sem nenhuma medicação. Sendo assim, nossos estudos prévios sugeriram níveis elevados de PIP₂ na membrana plaquetária durante a mania, e indiretamente, que o tratamento com o lítio ou outros estabilizadores de humor possa talvez reverter este fenômeno.

Com o objetivo de examinar mais diretamente os possíveis efeitos do lítio *in vivo* na via do PI em plaquetas de pacientes bipolares, nos conduzimos este estudo piloto. Nos quisemos examinar a hipótese de que o tratamento com o lítio em concentrações terapêuticas diminuiria o conteúdo relativo de fosfoinosítois de membrana nas plaquetas de pacientes bipolares não medicados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Sete pacientes bipolares (5 homens, 2 mulheres - média \pm D.P. idade=27.9 \pm 5.7 anos) foram estudados. Veja a [tabela 1](#) para um resumo da informação clínica e demográfica. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado para participar do estudo. Eles não tinham nenhum problema médico atual, outros transtornos psiquiátricos, ou história significativa de uso de álcool ou drogas. Problemas médicos foram excluídos por intermédio de um exame físico (conduzido por um assistente médico supervisionado por um médico licenciado), história médica, e exames laboratoriais rotineiros para “screening”. Todos os pacientes estavam em um episódio afetivo agudo no momento em que foram alistados neste estudo; um paciente estava num estado misto, 5 estavam deprimidos, e um estava maníaco. Eles não haviam recebido nenhuma medicação psicotrópica por pelo menos 2 semanas. Os pacientes foram estudados inicialmente enquanto não medicados ([tempo 1](#)), e estudados novamente depois de receberem lítio por pelo menos 21 dias ([tempo 2](#)). O intervalo entre o tempo 1 e tempo 2 variou de 21 a 41 dias (média \pm D.P.=28.7 \pm 7.1 dias). Quando os estudos pós-lítio foram completados (time 2), os pacientes estavam em doses de lítio que variavam de 900 a 1500 mg/dia (média \pm D.P. dose = 1200 \pm 260mg/dia), e os níveis de lítio 12 horas depois da última dose variavam de 0.52 a 1.48 mEq/L (média \pm D.P. = 0.85 \pm 0.35 mEq/L). Durante o período de tratamento, todos os pacientes receberam monoterapia com o lítio, e não receberam nenhuma medicação adjuvante.

Todos os pacientes preencheram o critério diagnóstico do DSM-IV para o transtorno bipolar (American Psychiatric Association 1994); 6 eram bipolares do tipo 1, e um era bipolar do tipo 2. O diagnóstico do DSM-IV foi estabelecido baseado em informação coletada com

uma entrevista SCID e confirmado subsequente em uma avaliação clínica com um médico psiquiatra assistente.

Medidas laboratoriais

Os níveis relativos de 3 classes de fosfoinosítois na membrana (PI, PIP, and PIP₂) foram estimados como previamente relatado (Soares et al. 1997; Soares et al. 1999b). Amostras de sangue (2 x 34 ml) foram coletadas com seringas plásticas contendo 6 ml do anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD) (Sigma Chemical Company). As preparações de membrana plaquetária foram obtidas como previamente relatado (Brown et al. 1993), e estocadas a -80°C; subsequente, elas foram degeladas a temperatura ambiente, e uma extração lipídica bifásica foi realizada. Os fosfolipídios de membrana foram separados e quantificados com a utilização de cromatografia de camada fina bidimensional em placas de performance alta, e densitometria a laser (Mallinger et al. 1993). A quantidade de cada classe de fosfolipídio foi obtida com um algoritmo que calculou um termo equivalente a volume (GelScan XL 2400 Software, version 2.1, Pharmacia LKB Biotechnology), baseado na área de cada fosfolipídio e na absorvância medida em cada área. Os fosfolipídios foram delineados e quantificados por um técnico cego para a identidade da amostra. Os valores foram expressos como unidades de absorvância versus área (AU x mm²), e as absorvâncias relativas de cada fosfoinosítois foram calculadas como uma percentagem da absorvância total. Todos os estudos cromatográficos foram conduzidos em quadruplicata. A sensibilidade deste método foi previamente determinada como menos de 10 ng de lípido fósforo. O coeficiente de variação médio intra-assay para os vários fosfoinosítois foi 12.6%.

Análise estatística

A análise estatística foi conduzida com o software SPSS para Windows, versão 8.0 (SPSS, Inc.). Os valores de fosfoinosítois em pacientes não medicados e após tratamento com

o lítio foram comparados usando um teste não-paramétrico para amostras pareadas, o teste de Wilcoxon Signed Ranks.

RESULTADOS

Os valores médios±D.P. para PI foram $5.63\pm 2.25\%$ e $5.21\pm 1.06\%$; PIP foram $0.68\pm 0.20\%$ e $0.55\pm 0.11\%$; e PIP₂ foram $0.60\pm 0.21\%$ e $0.38\pm 0.15\%$, antes e depois do tratamento com o lítio, respectivamente (tabela 2). A diminuição nos valores de PIP₂ depois de tratamento com o lítio foi estatisticamente significativa (Wilcoxon Signed Ranks Test, $Z=-2.37$, $p=0.02$). Como ilustrado na figura 1, os níveis de PIP₂ diminuíram em cada paciente depois do tratamento com o lítio, exceto em um aonde ele permaneceu basicamente o mesmo. A redução nos níveis de PIP depois de tratamento com o lítio foi considerada só uma tendência (Wilcoxon Signed Ranks Test, $Z=-2.03$, $p=0.04$), uma vez que não havia hipótese a priori para redução de PIP baseado nos nossos estudos anteriores, e o valor do p encontrado não foi estatisticamente significativo depois de correção de Bonferroni ($p>0.017$). Para os níveis de PIP₂, a correção de Bonferroni não foi realizada, uma vez que estes dados eram parte da nossa hipótese a priori para conduzir este estudo. A redução dos níveis de PI depois de tratamento com o lítio não foi estatisticamente significativa (Teste de Wilcoxon Signed Ranks, $Z=-0.17$, $p=0.87$).

DISCUSSÃO

Nosso estudo piloto fornece achados interessantes que sugerem que a administração de doses terapêuticas de lítio para pacientes bipolares pode resultar em diminuição significativa no conteúdo relativo de PIP₂ em membranas plaquetárias. Estes achados sugerem que o lítio reduz, *in vivo*, os níveis de membrana de um intermediário maior na via do PI (PIP₂) em plaquetas de pacientes bipolares, e que isto pode ser um mecanismo relevante para as ações terapêuticas do mesmo.

Há evidência emergente que sugere que uma disfunção na via do PI possa ser importante para a fisiopatologia do transtorno bipolar. Uma hiperatividade nesta via pode estar presente, o que poderia ser um traço do transtorno ou dependente da fase do mesmo. O lítio poderia ter eficácia no transtorno bipolar ao corrigir uma hiperatividade na via do PI e diminuir os níveis de membrana do PIP₂ para níveis menores do que os encontrados em voluntários normais não medicados (Soares et al. 1999b). Ele também parece reduzir o conteúdo dos outros fosfoinosítois (PIP e PI) na membrana, mas para estes as reduções parecem ser menores, e não foram estatisticamente significativas na pequena amostra de pacientes estudada. Uma redução nos níveis de PIP₂ na membrana, como resultado do tratamento com o lítio, poderia resultar em uma diminuição funcional no ciclo intracelular do PI, e diminuição na geração de mensageiros secundários nesta via, que poderia contrabalancear uma hiperatividade na via do PI em pacientes bipolares, e, portanto, ser terapêutico para o transtorno bipolar.

Um estudo conduzido recentemente em nosso laboratório encontrou uma variabilidade média intra-sujeitos de 18 % para as medidas plaquetárias de membrana de PIP₂ em voluntários normais sem nenhuma intervenção durante um período de 3 semanas (Soares

et al. 1999a). No nosso estudo atual, a mudança média nos valores de PIP₂ em membrana plaquetária depois do tratamento com o lítio foi 45 %, que foi consideravelmente mais alta do que a variabilidade normal teste/reteste previamente relatada em voluntários normais. Portanto, nossos dados atuais, apesar de preliminares, fornecem indicação de que estes efeitos possam ser o resultado da ação do lítio.

Uma possibilidade alternativa para explicar nossos achados atuais é que a diminuição dos níveis de membrana de PIP₂ seria um resultado da normalização do humor, ou redução dos sintomas, ao invés de refletir os efeitos do lítio na via do PI. O desenho do nosso estudo não nos permite excluir esta possibilidade. Estudos futuros com amostras maiores nos permitirão diferenciar possíveis efeitos do lítio nos níveis de PIP₂ em membrana plaquetária de efeitos que possam ser exclusivamente resultado da normalização do humor.

Uma limitação importante dos achados atuais é que os mesmos se originam de um modelo plaquetário. Apesar de plaquetas terem sido extensivamente utilizadas como modelo para o estudo *in vivo* de vários sistemas neurotransmissores (Ebstein et al. 1986; Pletscher 1986), não está claro se estas mudanças plaquetárias refletem os processos fisiológicos nos neurônios cerebrais *in vivo*. Não há métodos satisfatórios até o momento para se estudar a via intracelular do PI *in vivo* no cérebro humano. Avanços em métodos de imagem cerebral neuroquímica com tomografia por emissão de pósitrons (PET) (Imahori et al. 1992; Imahori et al. 1993) e ressonância magnética por espectroscopia (MRS) (Soares et al. 1996) podem eventualmente resultar no desenvolvimento de métodos viáveis para se examinar os mecanismos de transdução de sinais no cérebro humano *in vivo*.

Estudos futuros devem examinar a possibilidade de que os níveis de fosfoinosítois de membrana, após administração do lítio, ou mudanças nestes níveis resultantes do tratamento com o lítio, possam estar correlacionados com resposta ao tratamento. Nos não pudemos

examinar correlatos clínicos dos efeitos nos níveis de fosfoinosítois no estudo atual por causa do pequeno tamanho da amostra.

Se a diminuição dos níveis de membrana do PIP₂, conforme sugerida pelos nossos resultados preliminares, for confirmada como um mecanismo crítico nos efeitos do lítio em pacientes bipolares, isto poderia guiar esforços futuros para o desenvolvimento de novas medicações que possam atuar na via intracelular do PI. Uma área interessante para desenvolvimento farmacológico é a busca de inibidores seletivos da inositol monofosfatase (Atack 1995), ou intervenções direcionadas a modulação da via do PI com a administração oral de inositol (Belmaker et al. 1995), que poderiam constituir tratamentos com novos mecanismos de ação para pacientes bipolares. Um melhor esclarecimento das anormalidades nas vias intracelulares de transdução de sinais em pacientes bipolares poderia eventualmente resultar no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento destes pacientes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pelas verbas MH 29618 e MH 30915 do National Institute of Mental Health, the Stanley Center for the Innovative Treatment of Bipolar Disorder, University of Pittsburgh, e National Alliance for Research in Schizophrenia and Affective Disorders (NARSAD).

REFERÊNCIAS

- Agam G, Livne A (1989) Inositol-1-phosphatase of human erythrocytes is inhibited by therapeutic lithium concentrations. *Psychiatry Research* 27: 217-224
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fourth edition. American Psychiatric Press, Washington, D.C.
- Atack JR (1995) Inositol monophosphatase inhibitors: a novel treatment for bipolar disorder? *Biological Psychiatry* 37: 761-763
- Baraban JM, Worley PF, Snyder SH (1989) Second messenger systems and psychoactive drug action: Focus on the phosphoinositide system and lithium. *American Journal of Psychiatry* 146: 1251-1260
- Belmaker RH, Bersudsky Y, Agam G, Levine J, Kofman O (1996) How does lithium work on manic depression? Clinical and psychological correlates of the inositol theory. *Annual Review of Medicine* 47: 47-56
- Belmaker RH, Bersudsky Y, Benjamin J, Agam G, Levine J, Kofman O (1995) Manipulation of inositol-linked second messenger systems as a therapeutic strategy in psychiatry. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 49: 67-84
- Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR (1989) Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59: 411-419
- Brown AS, Mallinger AG, Renbaum LC (1993) Elevated platelet membrana phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in bipolar mania. *American Journal of Psychiatry* 150: 1252-1254
- Drummond AH (1988) Lithium affects G-protein receptor coupling. *Nature* 331: 388

Dubovsky SL, Murphy J, Christiano J, Lee C (1992) The calcium second messenger system in bipolar disorders: data supporting new research directions. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 4: 3-14

Ebstein RP, Lerer B, Bennett ER, Dayek DB, Newman ME, Shapira B, Kindler S (1986) Second messenger function in lymphocytes and platelets: a comparison of peripheral and central mechanisms. *Clinical Neuropharmacology* 9: 350-352

Eckert A, Gann H, Riemann D, Aldenhoff J, Muller WE (1994) Platelet and lymphocyte free intracellular calcium in affective disorders. *European Archives of Psychiatry & Clinical Neuroscience* 243: 235-239

Forstner U, Bohus M, Gebicke-Harter PJ, Baumer B, Berger M, van Calker D (1994) Decreased agonist-stimulated Ca²⁺ response in neutrophils from patients under chronic lithium therapy. *European Archives of Psychiatry & Clinical Neuroscience* 243: 240-243

Friedman E, Hoau-Yan-Wang, Levinson D, Connell TA, Singh H (1993) Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biological Psychiatry* 33: 520-525

Gershon S, Soares JC (1997) Commentary - Current therapeutic profile of lithium. *Archives of General Psychiatry* 54: 16-20

Imahori Y, Fujii R, Ueda S, Matsumoto K, Wakita K, Ido T, Nariai T, Nakahashi H (1992) Membrane trapping of carbon-11-labeled 1,2-diacylglycerols as a basic concept for assessing phosphatidylinositol turnover in neurotransmission process. *Journal of Nuclear Medicine* 33: 413-422

Imahori Y, Fujii R, Ueda S, Ohmori Y, Wakita K, Matsumoto K (1993) Phosphoinositide turnover imaging linked to muscarinic cholinergic receptor in the central nervous system by positron emission tomography. *Journal of Nuclear Medicine* 34: 1543-51

Joje RS, Song L, Li PP, Young LT, Kish SJ, Pacheco MA, Warsh JJ (1996) The phosphoinositide signal transduction system is impaired in bipolar affective disorder brain. *Journal of Neurochemistry* 66: 2402-2409

Kusumi I, Koyama T, Yamashita I (1992) Thrombin-induced platelet calcium mobilization is enhanced in bipolar disorders. *Biological Psychiatry* 32: 731-734

Lachman HM, Papolos DF (1989) Abnormal signal transduction: a hypothetical model for bipolar affective disorder. *Life Sciences* 45: 1413-1426

Lenox RH, Watson DG (1994) Lithium and the brain: a psychopharmacological strategy to a molecular basis for manic depressive illness. *Clinical Chemistry* 40: 309-314

Mallinger AG, Yao JK, Brown AS, Dippold CS (1993) Analysis of complex mixtures of phospholipid classes from cell membranes using two-dimensional thin-layer chromatography and scanning laser densitometry. *Journal of Chromatography* 614: 67-75

Manji HK, Chen G, Shimon H, Hsiao JK, Potter WZ, Belmaker RH (1995a) Guanine nucleotide-binding proteins in bipolar affective disorder. Effects of long-term lithium treatment. *Archives of General Psychiatry* 52: 135-44

Manji HK, Potter WZ, Lenox RH (1995b) Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Archives of General Psychiatry* 52: 531-543

Molchan SE, Atack JR, Sunderland T (1994) Decreased CSF inositol monophosphatase activity after lithium treatment. *Psychiatry Research* 53: 103-105

Moscovich DG, Belmaker RH, Agam G, Livne A (1990) Inositol-1-phosphatase in red blood cells of manic-depressive patients before and during treatment with lithium. *Biological Psychiatry* 27: 552-555

Pletscher A (1986) Blood platelets as neuronal models: use and limitations. *Clinical Neuropharmacology* 9: 344-346

Schou M (1997) Forty years of lithium treatment. *Archives of General Psychiatry* 54: 9-13

Snyder SH (1992) Second messengers and affective illness - Focus on the phosphoinositide cycle. *Pharmacopsychiatry* 25: 25-28

Soares JC, Dippold BS, Wells KF, Houck P, Mallinger AG (1999a) Reproducibility of in vivo measures of platelet membrana phospholipids in human subjects. *Psychiatry Research* 86:107-112.

Soares JC, Dippold CS, Mallinger AG (1997) Platelet membrana phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate alterations in bipolar disorder - Evidence from a single case study. *Psychiatry Research* 69: 197-202

Soares JC, Dippold CS, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ (1999b) Platelet membrana phospholipids in euthymic bipolar disorder patients: Are they affected by lithium treatment? *Biological Psychiatry* 45:453-457.

Soares JC, Gershon S (1998) The lithium ion: a foundation for psychopharmacological specificity. *Neuropsychopharmacology* 19: 167-182

Soares JC, Krishnan KRR, Keshavan MS (1996) Nuclear magnetic resonance spectroscopy - New insights into the pathophysiology of mood disorders. *Depression* 4: 14-30

Soares JC, Mallinger AG (1996) Abnormal phosphatidylinositol (PI)-signalling in bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 39: 461-462

Soares JS, Mallinger AG (1997) Intracellular phosphatidylinositol pathway abnormalities in bipolar disorder patients. *Psychopharmacology Bulletin* 33: 685-691

Vadnal R, Parthasarathy R (1995) Myo-inositol monophosphatase: diverse effects of lithium, carbamazepine, and valproate. *Neuropsychopharmacology* 12: 277-285

Wachtel H (1989) Dysbalance of neuronal second messenger function in the aetiology of affective disorders: a pathophysiological concept hypothesizing defects beyond first messenger receptors. *Journal of Neural Transmission* 75: 21-29

Young LT, Li PP, Kish SJ, Siu KP, Warsh JJ (1991) Postmortem cerebral cortex Gs alpha-subunit levels are elevated in bipolar affective disorder. *Brain Research* 553: 323-326

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

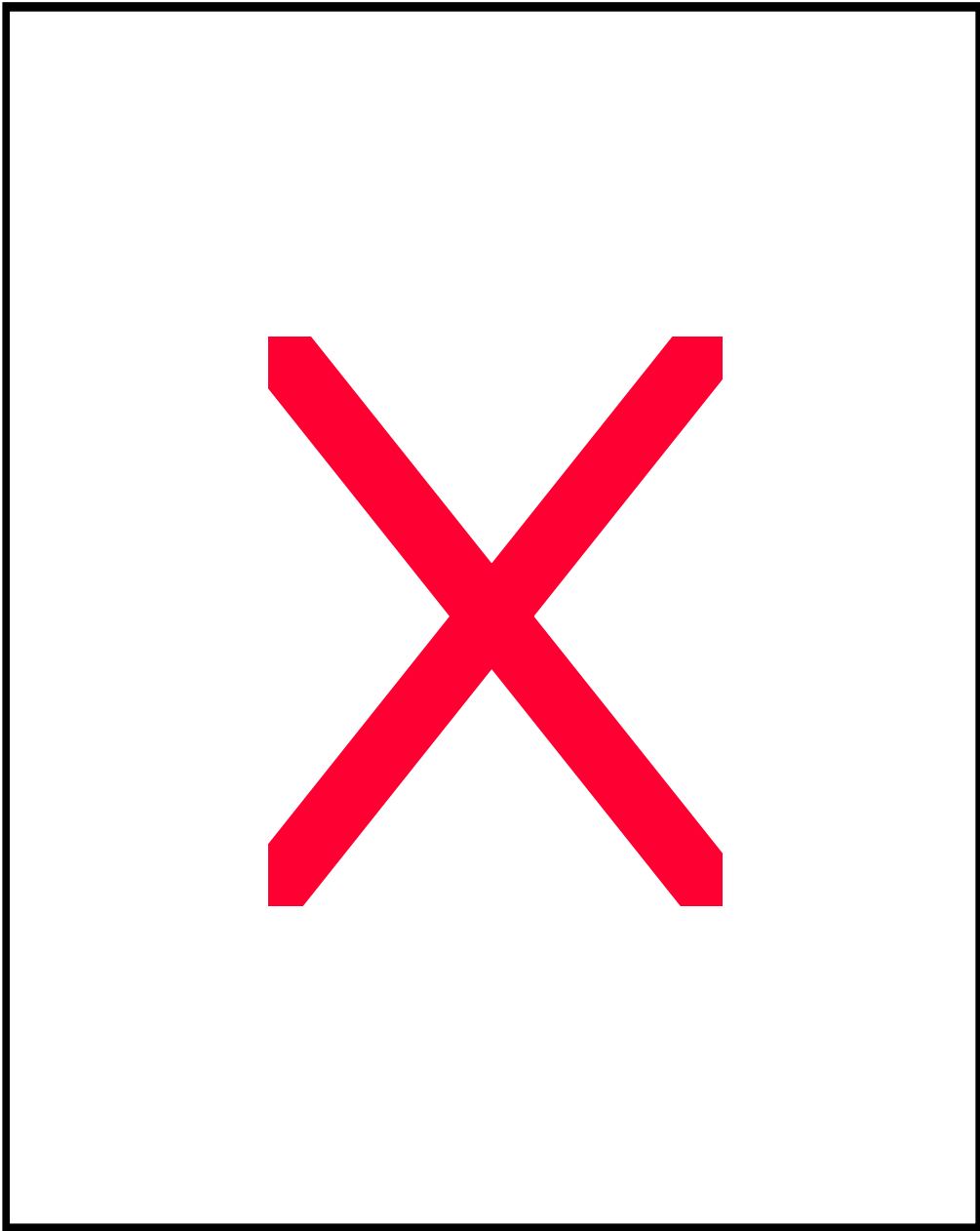
Paciente	Idade	Sexo	Fase	Dose do Li (mg/dia)	Nível sérico do Li (mEq/L)	INTERVALO (dias)
1	20	M	maníaco	1350	1.11	21
2	24	M	misto	1500	0.92	22
3	28	F	dep	900	0.66	31
4	28	F	dep	1050	0.52	26
5	33	M	dep	900	0.62	26
6	37	M	dep	1500	1.48	41
7	25	M	dep	1200	0.63	34
MÉDIA	27.9			1200	0.85	28.7
D.P.	5.7			260	0.35	7.1

Li=lítio. Intervalo= intervalo de tempo entre estudos antes e depois do tratamento com o lítio.
Dep=deprimido.

TABELA 2 – VALORES PLAQUETÁRIOS DE FOSFOINOSITOIS EM PACIENTES BIPOLARES

PACIENTES	PIP2 – NÃO MEDICADO	PIP2 – APÓS Li	PIP – NÃO MEDICADO	PIP – APÓS Li	PI – NÃO MEDICADO	PI – APÓS Li
1	0.29 %	0.27 %	0.41%	0.40 %	4.27%	3.08 %
2	0.48 %	0.33 %	0.71%	0.63 %	5.12%	5.95 %
3	0.50 %	0.24 %	0.68%	0.62 %	10.39 %	6.14 %
4	0.85 %	0.36 %	1.05%	0.52 %	3.45%	4.65 %
5	0.71 %	0.39 %	0.54%	0.41 %	5.26%	5.57 %
6	0.50 %	0.39 %	0.66%	0.69 %	4.83%	5.25 %
7	0.84 %	0.71 %	0.70%	0.56 %	6.08%	5.83 %
Media	0.60 %	0.38 %	0.68%	0.55 %	5.63%	5.21 %
D.P.	0.21 %	0.15 %	0.20%	0.11 %	2.26%	1.06 %

Pacientes foram inicialmente estudados enquanto não medicados, e subsequentemente os estudos foram repetidos após tratamento com lítio. Os valores foram expressos como percentagens das absorbâncias totais para fosfolípidios.



LEGENDA DA FIGURA 1

A Figura 1 ilustra os valores de membrana de PIP₂ em pacientes não medicados e depois de > 3 semanas em tratamento com lítio. Os níveis de PIP₂ foram reduzidos significativamente após tratamento com o lítio nos 7 pacientes bipolares estudados (média±d.p.= 0.60±0.21% e 0.38±0.15%, respectivamente, Wilcoxon Signed Ranks Test, Z=-2.37, p=0.02). Os valores médios para pacientes não medicados e após tratamento com o lítio aparecem marcados como uma linha transversal na figura.

**MEDIDAS CONCOMITANTES DE PROTEINA QUINASE C E
FOSFOINOSITOIS EM PACIENTES BIPOLARES TRATADOS COM LÍTIO E
VOLUNTÁRIOS NORMAIS: UM ESTUDO PRELIMINAR**

Jair C. Soares¹, Guang Chen², Christine S. Dippold¹, Kelly Forster Wells¹, Ellen Frank^{1,3},
David J. Kupfer^{1,4}, Hussein K. Manji², Alan G. Mallinger^{1,5}

¹Department of Psychiatry, Western Psychiatric Institute and Clinic, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA; ²Department of Psychiatry, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI; ³Department of Psychology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA; ⁴Department of Neurosciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA.; ⁵Department of Pharmacology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA

Publicado em Psychiatry Research 95: 109-118, 2000

Este trabalho foi parcialmente financiado por verbas do NIMH (MH 29618 and MH 30915), Stanley Foundation, e National Alliance for Research in Schizophrenia and Affective Disorders (NARSAD). Estes dados foram apresentados anteriormente no congresso anual da Society for Neuroscience, Novembro 7-12, 1998, Los Angeles, C.A.

RESUMO

Este estudo examinou a hipótese de que o tratamento com o lítio iniba a via sinalizadora do PI, in vivo, através de medidas concomitantes de isoenzimas de PKC e de fosfoinosítois de membrana plaquetária em pacientes bipolares tratados com lítio e voluntários normais. Os níveis plaquetários (em membrana e citosol) de PKC alfa, beta I, beta II, delta, e epsilon foram medidos com a técnica de Western blotting. Os conteúdos relativos na membrana plaquetária de fosfoinositol (PI), fosfoinositol-4-fosfato (PIP), e fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) foram medidos com cromatografia bidimensional de camada fina. Nove pacientes bipolares eutímicos tratados com lítio e 11 voluntários normais foram estudados. Comparado com os voluntários normais, os pacientes bipolares tratados com o lítio tiveram níveis significativamente reduzidos de isoenzima alfa de PKC, fração citosólica (teste $t=-3.24$, $df.=17$, $p=0.01$) e de níveis plaquetários de PIP₂ (teste $t=-2.51$, $df=18$, $p=0.02$), e uma tendência a níveis reduzidos de PKC isoenzima beta II, fração citosólica (teste $t=-2.17$, $d.f.=17$, $p=0.05$). Não houve nenhuma correlação significativa entre os níveis de PIP₂ e nenhuma das isoenzimas de PKC. Estes achados preliminares sugerem que o tratamento crônico com o lítio possa reduzir os níveis tanto da isoenzima alfa da PKC, fração citosólica, como dos níveis de PIP₂ em membrana em plaquetas de pacientes bipolares.

Palavras-chave: lítio, fosfoinosítois, fosfoinositol-4,5-bifosfato, proteína quinase C, transtorno afetivo bipolar, psicofarmacologia, transdução de sinais

INTRODUÇÃO

Anormalidades nos processos intracelulares de transdução de sinais podem estar presentes em indivíduos com transtorno afetivo bipolar (Hudson et al 1993; Lachman and Papolos 1989; Manji et al 1995; Schreiber and Avissar 1991; Soares and Mallinger in press; Wachtel 1989; Wachtel 1990; Hahn and Friedman, 1999; Perez et al, 2000). Particularmente, a via do fosfoinositol (PI) pode ser um sítio de disfunção (Baraban et al 1989; Brown et al 1993; Jope et al 1996; Snyder 1992; Soares et al 1999a; Soares and Mallinger 1996; Soares and Mallinger 1997). Lítio e outras medicações efetivas para o tratamento deste transtorno podem exercer seus efeitos através da modulação destes processos intracelulares (Baraban et al 1989; Bitran et al 1995; Lenox et al 1998; Lenox and Watson 1994; Manji et al 1996a; Manji et al 1993; Manji et al 1995; Soares et al 1999b).

A hiperatividade da via do PI pode se refletir em níveis aumentados de fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), que é o substrato principal para a produção de inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Isto poderia possivelmente resultar em atividade aumentada de isoenzimas específicas de PKC (Soares e Mallinger 1997). Um relato preliminar demonstrou valores de PIP_2 em membrana plaquetária aumentados em pacientes bipolares na fase maníaca (Brown et al 1993), e relatos subsequentes sugeriram que o tratamento com o lítio em doses terapêuticas poderia diminuir significativamente os níveis de PIP_2 em membrana plaquetária (Soares et al 1997; Soares et al 1999a; Soares et al 1999b). De maneira semelhante, atividade aumentada de PKC plaquetária foi relatada em pacientes bipolares não-medicados na fase maníaca comparados com voluntários normais, e o tratamento com o lítio em doses terapêuticas reduziu esta atividade (Friedman et al 1993). Em cérebros pós-mortem de pacientes bipolares, uma distribuição subcelular alterada de

isoenzimas de PKC, compatíveis com um aumento de ativação de PKC, também foi relatado (Wang e Friedman 1996). Estes achados estão, de maneira geral, em acordo com dados de estudos *in vitro* demonstrando que o tratamento com o lítio inibe a via do PI e interfere com processos mediados por PKC (Wang and Friedman, 1989; Baraban et al 1989; Belmaker et al 1995; Bitran et al 1995; Lenox et al 1998; Lenox and Watson 1994; Manji et al 1996a; Manji et al 1993; Manji and Lenox 1994; Manji et al 1995).

O presente estudo foi conduzido através de medidas concomitantes de isoenzimas de PKC e níveis de PIP₂ em plaquetas de pacientes bipolares tratados com o lítio e voluntários normais, para se examinar a hipótese da inibição destes processos de transdução de sinais pelo lítio. Nos testamos a hipótese de que os níveis de PKC alfa e PIP₂ estariam significativamente reduzidos em pacientes tratados com o lítio comparado com voluntários normais. De uma maneira exploratória, nos também examinamos a existência de correlações entre os níveis plaquetários de PIP₂ e as isoenzimas de PKC em pacientes bipolares tratados com o lítio e voluntários normais.

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES

Nove pacientes bipolares do tipo I (4 homens, 5 mulheres - média \pm D.P. idade=42.0 \pm 8.2 anos) foram estudados. Eles não tinham nenhum problema médico, nenhuma comorbidade psiquiátrica, e nenhuma história recente significativa de abuso de substâncias. Todos os pacientes estavam eutímicos e tinham estado sob tratamento com lítio por pelo menos um mês. Os pacientes estavam em doses de lítio variando de 900 a 1650mg/dia (dose média=1200 mg/dia), resultando em níveis séricos de lítio após 12 horas que variavam de 0.32 to 0.94 mEq/L (média \pm D.P.=0.60 \pm 0.19 mEq/L). Todos os pacientes estavam sendo tratados com monoterapia com o lítio e não tinham recebido nenhuma outra medicação por pelo menos duas semanas, com exceção de um paciente que recebeu uma dose única de ibuprofeno um dia antes do estudo.

Onze voluntários normais foram estudados (4 homens, 7 mulheres; média de idade \pm D.P.=33.6 \pm 8.5 anos); eles não tinham nenhuma história de problemas psiquiátricos, e não tinham história significativa de uso de substâncias ou problemas médicos presentes. Transtornos psiquiátricos foram excluídos com a utilização da entrevista do SCID-IV, versão para não-pacientes. Estes indivíduos não tinham nenhuma história de transtornos psiquiátricos entre familiares de primeiro grau.

PROCEDIMENTOS CLÍNICOS

Os pacientes foram seguidos no **Depression and Manic Depression Prevention Program (DMDPP)**, um programa de pesquisa ambulatorial do Western Psychiatric Institute and Clinic, University of Pittsburgh Medical Center. Todos os pacientes preencheram o critério diagnóstico do DSM-IV para o transtorno bipolar do tipo I, conforme determinado na entrevista de SCID (Spitzer et al 1994), e confirmados em uma avaliação clínica conduzida por um médico psiquiatra assistente. O diagnóstico foi

subseqüentemente revisto em uma reunião de consenso com o profissional que completou o SCID, a coordenadora de pesquisa do programa, e um investigador sênior. Depois dos procedimentos terem sido explicados para os pacientes, termo de consentimento escrito para participação no estudo foi obtido. Uma amostra de sangue foi obtida de uma veia periférica para medidas plaquetárias de isoenzimas de PKC e fosfoinositois. As amostras de sangue foram obtidas no intervalo entre as 10:00 e 13:00 horas. Os pacientes sentaram em uma cadeira por pelo menos 15 minutos antes das amostras de sangue serem coletadas. As amostras de sangue foram coletadas com agulhas butterfly de calibre 21 em seringas plásticas.

Medidas de PKC

Amostras de sangue (2 x 25 ml) foram coletadas em seringas plásticas de 60 ml contendo 3 ml de anticoagulante ácido citrato dextrose (Sigma Chemical Company, USA). As preparações de membrana plaquetária foram obtidas imediatamente depois de coletar o sangue e estocadas a -80°C . Os homogenados foram centrifugados a $14,000 \times g$ por 10 min. para remover debris não dissolvidos. A linearidade da concentração protéica para o immunoblotting das isoenzimas de PKC foi determinada através da resolução de concentrações seletas de proteína. Immunoblotting de isoenzimas de PKC subseqüentemente foram realizados com a utilização de concentrações proteicas que estavam dentro da faixa linear para Western blotting com a utilização de métodos descritos anteriormente (Molchan et al 1993; Chen et al 1998). Brevemente, as amostras foram colocadas em SDS-PAGE em gels de 10% poliacrilamida. As proteínas resolvidas desta forma foram então eletroforeticamente transferidas para membranas de nitrocelulose. Binding não-específico nas membranas de nitrocelulose foi bloqueado com uma solução de 50 mM Tris (pH=8.0, 2mM CaCl_2 , 80 mM NaCl, 5% leite seco sem gordura, 0.2% NP-40,

e 0.02% NaN₃). Os blots foram incubados durante a noite em temperatura ambiente com anticorpos específicos para as isoenzimas de PKC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; diluídos 1:100); cinco isoenzimas de PKC (alpha, beta I, beta II, delta, e epsilon) foram medidas nas frações citosólicas e de membrana. Os imunocomplexos foram detectados com um kit Amersham ECL ou ECL plus, e a quantificação foi feita com densitometria com a utilização de um sistema para análise de imagens (NIH 1.55). Uma alíquota de estándares plaquetários de frações membranosas e citosólicas foi colocado em cada coluna do gel, para permitir normalização dos dados em relação aos estándares, para minimizar variabilidade entre os ensaios. Os valores finais de isoenzimas de PKC foram expressos como unidades de densidade ótica normalizadas.

Medidas de fosfolipídios

Os fosfolipídios de membrana plaquetária foram medidos como relatado anteriormente (Mallinger et al 1993). Amostras de sangue (2 x 34 ml) foram coletadas em seringas plásticas contendo 6 ml de anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD) em cada uma (Sigma Chemical Company, USA). As preparações de membrana plaquetária foram obtidas imediatamente após a coleta de sangue, e então estocadas a -80°C. Subseqüentemente, as suspensões de membrana plaquetária foram descongeladas a temperatura ambiente, e uma extração lipídica bifásica foi realizada. Os fosfolipídios de membrana foram separados com a utilização de cromatografia bidimensional de camada fina em pratos de alta performance e quantificados com densitometria a laser. Os fosfolipídios foram delineados e quantificados com o software GelScan XL 2400 (versão 2.1, Pharmacia LKB Biotechnology), por um assistente de pesquisa que estava cego para a identidade da amostra. Os valores foram expressos como unidade de absorvância versus área (AU x mm²), e as absorvâncias relativas

para cada fosfoinositol foram calculadas como uma porcentagem da absorbância total de fosfolipídios.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software SPSS para Windows, versão 7.5 (SPSS, Inc.). Testes t foram utilizados para cada variável dependente. Coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para examinar a existência de correlação entre isoenzimas de PKC, fosfoinositois, e variáveis clínicas.

RESULTADOS

Pacientes bipolares tratados com o lítio tiveram níveis de PKC alfa citosólica significativamente reduzidos comparados com voluntários normais (media±D.P.= 708±670 e 1529±438, mediana = 556 e 1568, respectivamente; teste $t = -3.24$, d.f.=17, $p=0.01$) (veja [figura 1](#)). Houve também uma tendência para valores menores de PKC beta II citosólica em pacientes (media±D.P.=1578±1468 e 2711±798, mediana= 1397 e 3023, respectivamente; teste $t = -2.17$, d.f.=17, $p=0.05$). Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles para as outras isoenzimas de PKC que foram medidas ([tabela 1](#)). A [figura 2](#) contém um immunoblot de um paciente tratado com o lítio e de um voluntário normal, para ilustrar o método utilizado.

Pacientes bipolares tiveram níveis de PIP_2 significativamente reduzidos comparados com voluntários normais ($0.3\pm 0.1\%$ e $0.4\pm 0.1\%$, respectivamente; teste $t = -2.51$, d.f.=18, $p=0.02$), mas não houve diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles para os níveis de PI ($4.9\pm 0.8\%$ e $5.2\pm 1.7\%$, respectivamente; $t = -0.38$, d.f.=18, $p=0.71$) ou PIP ($0.6\pm 0.2\%$ e $0.7\pm 0.2\%$, respectivamente; $t = -0.86$, d.f.=18, $p=0.40$). Os valores de fosfoinositois que foram incluídos neste relato se originam de uma amostra de pacientes bipolares e voluntários normais que tem um grande “overlap” com a amostra que nós previamente publicamos num outro manuscrito (Soares et al 1999a), mas estes dados foram também incluídos aqui para que pudéssemos examinar possíveis correlações com valores de PKC, que são o foco deste novo manuscrito.

Nós refizemos todos os testes t depois de utilizar transformação logarítmica dos dados, para comparar os valores plaquetários de isoenzimas de PKC e de fosfoinositois entre pacientes tratados com lítio e voluntários normais. Os resultados destas análises

foram basicamente os mesmos, e o valor de significância estatística p para a PKC alfa citosólica foi 0.01 e para PIP₂ foi 0.02. Os valores de p para a PKC beta II citosólica foi 0.05, e para a PKC beta I citosólica foi 0.05.

Não houve nenhuma correlação significativa entre quaisquer das isoenzimas de PKC e os valores de fosfoinositois plaquetários em pacientes bipolares ou voluntários normais (coeficiente de correlação de Pearson, $p > 0.05$). Interessantemente, PKC alfa citosólica e PIP₂ não estavam significativamente correlacionados em pacientes bipolares ($n=8$; coeficiente de correlação de Pearson = -0.610; $p=0.108$) ou em voluntários normais ($n=11$; coeficiente de correlação de Pearson = -0.352; $p=0.289$) (veja [figura 3](#)). Idade não estava significativamente correlacionada com valores de fosfoinositois ou isoenzimas de PKC em pacientes ou voluntários normais (coeficiente de correlação de Pearson, $p > 0.05$).

Os valores de litemia (obtida 12 horas após a última dose de lítio) não se correlacionaram significativamente com nenhuma das medidas de isoenzimas de PKC ou medidas de fosfoinositois (coeficiente de correlação de Pearson, $p > 0.05$). Esta análise foi repetida após a exclusão de 3 indivíduos que tiveram litemia de 12 horas na faixa subterapêutica, que para o propósito desta análise foi considerado < 0.5 mEq/L, e ainda não houve nenhuma correlação significativa. Três dos 9 pacientes bipolares haviam estado em tratamento com lítio por pelo menos 3 meses quando as amostras de sangue para este estudo foram coletadas (todos estavam em tratamento com o lítio por pelo menos um mês); todos os outros haviam estado em tratamento com o lítio por pelo menos vários meses ou anos. A $\text{media} \pm \text{D.P.}$ para o tempo de tratamento com o lítio para esta amostra de pacientes foi de 130 ± 92 semanas, mediana = 167 semanas. Não houve correlação significativa entre o tempo de tratamento com o lítio e os valores de isoenzimas de PKC ou valores de fosfoinositois (coeficiente de correlação de Pearson, $p > 0.05$).

DISCUSSÃO

Nossos achados preliminares constituem o primeiro relato de medidas concomitantes de isoenzimas de PKC e níveis de fosfoinosítois em plaquetas de pacientes bipolares e voluntários normais. Nos encontramos níveis reduzidos de PKC alfa citosólica e PIP₂ em plaquetas em pacientes tratados com lítio comparados com voluntários normais, sugerindo que o tratamento com o lítio possa reduzir significativamente os níveis destes dois intermediários *in vivo* em pacientes bipolares, e que, mais genericamente, possa reduzir a atividade do sistema de transdução de sinais da via do PI.

Os achados de redução de atividade plaquetária de PKC alfa citosólica em pacientes tratados com o lítio são consistentes com um relato anterior que encontrou uma redução na atividade plaquetária de PKC em pacientes bipolares depois de 2 semanas de tratamento (Friedman et al 1993). Estes achados também estão de acordo com estudos pré-clínicos em roedores e em cultura de células, que tem demonstrado que o lítio exerce efeitos significativos em PKC e seus substratos (Reisine and Zatz, 1987; Zatz and Reisine, 1988; Wang and Friedman, 1989; Casebolt and Jope, 1992; Lenox et al., 1992; Manji et al 1993; Jensen and Mork, 1997; Watson and Lenox, 1996; revisado em Jope 1999, Manji and Lenox, 1999). Em contraste com muitos dos estudos anteriores com roedores e com culturas de células, o presente estudo encontrou níveis plaquetários reduzidos de PKC alfa em pacientes bipolares tratados com o lítio somente na fração citosólica. Isto pode refletir diferenças basais na localização subcelular citosol/membrana desta isoenzima em pacientes bipolares, a natureza não-nuclear das plaquetas comparadas com outros tecidos utilizados em investigações anteriores, ou uma combinação destes fatores. As diferenças potenciais

dos efeitos do lítio em plaquetas comparado com neurônio cerebrais devem ser investigados em estudos futuros.

Neste estudo preliminar, nós também encontramos uma tendência não estatisticamente significativa para níveis plaquetários reduzidos de PKC beta I and beta II citosólicas em pacientes tratados com o lítio. Estes achados não estão de acordo com achados anteriores em tecido cerebral, como discutido acima, e devem ser investigados em amostras maiores de pacientes.

Os valores de PIP₂ foram significativamente reduzidos em pacientes bipolares tratados com o lítio comparados com voluntários normais, como relatado previamente (Soares et al 1999a). Seis dos 10 pacientes bipolares, e 10 dos 11 voluntários normais incluídos naquele relato anterior estão entre os indivíduos incluídos neste estudo. Os dados para fosfoinosítois daquele estudo também foram incluídos aqui para examinar, de maneira exploratória, possíveis correlações entre PKC e PIP₂. Níveis plaquetários diminuídos de PIP₂ são consistentes com achados *in vitro* e *in vivo* de estudos com animais que demonstram efeitos significativos do tratamento com o lítio na via do PI (Baraban et al 1989; Lenox et al 1998; Lenox and Watson 1994; Manji et al 1996b; Manji et al 1995; Snyder 1992); no entanto, eles não estão de acordo com estudos animais que não demonstraram efeitos específicos do lítio em PIP₂ em cérebros de roedores (Ishima et al 1993; Sherman et al 1986; Sherman et al 1985). A redução nos níveis de PIP₂ em plaquetas de pacientes bipolares eutímicos tratados com o lítio comparado com voluntários normais, aqui relatada, pode refletir os efeitos do tratamento com o lítio. O desenho transversal utilizado neste estudo não nos permite estabelecer isto com certeza; no entanto, esta hipótese estaria de acordo com um estudo de seguimento que envolveu 7 pacientes bipolares não-medicados, que foram estudados de novo depois de pelo menos 3 semanas

de tratamento com o lítio, durante o qual os valores de PIP_2 foram significativamente reduzidos (Soares et al 1999b). Estes achados também estariam de acordo com achados recentes de MRS que sugeriram que o tratamento com o lítio diminui as concentrações de mio-inositol no lobo frontal em pacientes bipolares (Moore et al 1999). Estes resultados também se seguem a demonstração preliminar de efeitos antimaníacos de um inibidor de PKC (tamoxifeno) (Bebchuk et al., 1999), e contribuem para a quantidade crescente de dados que implica a via de transdução de sinais de PKC no tratamento do transtorno bipolar (Manji and Lenox, 1999). No entanto, estes achados precisam ser vistos como preliminares e replicação dos mesmos em amostras maiores de pacientes será muito importante.

A ausência de correlação significativa entre os níveis plaquetários de isoenzimas de PKC e fosfoinositois, se confirmada em estudos subsequentes, seria consistente com o fato de que há inter-regulação extensa entre as vias intracelulares de transdução de sinais (como revisto por Manji et al, 1995). De maneira alternativa, poderia ser também consistente com a hipótese destes serem eventos independentes nos mecanismos de ação do lítio. No entanto, uma resposta definitiva a esta questão deveria se originar de estudos longitudinais que envolvam amostras maiores de pacientes que especificamente investiguem alterações induzidas pelo lítio com um desenho clínico que envolva medidas basais e após tratamento.

Aumento da atividade de PKC na membrana plaquetária no estado maníaco foi relatado previamente (Friedman et al 1993; Friedman et al 1995). Caso esteja presente, este poderia refletir uma ação do DAG resultante de uma hiperativação da via do PI no transtorno bipolar (Soares and Mallinger 1997). Aumento da atividade da via do PI no estado maníaco também pode se refletir nos achados de aumento do conteúdo de

membrana plaquetária de PIP₂, o precursor principal para produção de IP₃ e DAG, em pacientes não medicados (Brown et al 1993). Pacientes bipolares não medicados em varias fases do transtorno devem ser estudados para se esclarecer o papel da fase do transtorno nas alterações dos níveis de PIP₂ ou PKC, e para se determinar se alguma anormalidade existente seria um traço do transtorno ou achados relacionados à fase do mesmo. Tais estudos longitudinais também ajudariam a esclarecer se os níveis plaquetários reduzidos de PIP₂ ou PKC alfa citosólica são o resultado do tratamento com o lítio, ou se os mesmos refletem a normalização do humor. Em um relato recente envolvendo pacientes unipolares deprimidos, Pandey et al (Pandey et al., 1998) encontraram evidência de aumento da formação de PKC em plaquetas de pacientes não medicados comparados com voluntários normais, utilizando um método com [3H]forbol dibutirato, que sugeriu anormalidades em PKC no estado deprimido. No entanto, outro relato recente (Young et al., 1999) que envolveu pacientes bipolares não medicados, primariamente deprimidos, e também um grupo de pacientes bipolares eutímicos que tinham sido tratados com lítio por pelo menos 6 meses não encontraram diferenças significativas nos níveis plaquetários de PKC alfa comparados com voluntários normais. Estudos futuros devem tentar esclarecer estes achados conflitantes.

Uma limitação do nosso estudo foi que o grupo de pacientes era um pouco mais velho que o grupo de voluntários normais (42.0±8.2 e 33.6±8.5 anos, respectivamente). No entanto, não houve correlação significativa entre idade e isoenzimas de PKC ou fosfoinosítois. Adicionalmente, um dos nossos pacientes bipolares recebeu uma dose única de ibuprofeno no dia do estudo. Este é um fator que pode introduzir vieses, uma vez que antiinflamatórios não hormonais tem efeitos conhecidos na função plaquetária. No entanto, os dados para este indivíduo estavam na mesma faixa consistente com os valores

apresentados por outros indivíduos neste mesmo grupo, e nós elegemos manter este indivíduo na nossa base de dados. Nos repetimos a análise dos dados sem incluir este indivíduo, e os resultados significativos para redução de PIP₂ e PKC alfa citosólica em pacientes bipolares permaneceram inalterados.

Outra limitação em potencial é o fato de que estes estudos utilizaram um modelo plaquetário, e não é sabido se plaquetas refletem os processos *in vivo* do cérebro humano para estas vias específicas estudadas. Plaquetas têm sido utilizadas como modelo em vários estudos humanos neurofarmacológicos, na ausência de meios diretos de se estudar processos intracelulares de transdução de sinais no cérebro humano *in vivo* (Pletscher 1986; Rotman 1983; Stahl 1985). Uma consideração importante em tais estudos é, claramente, a questão de se células de tecidos periféricos são um modelo adequado para se estudar vias bioquímicas de interesse no sistema nervoso central. Um estudo recente investigou a correlação entre alterações induzidas pelo lítio em PKC alfa no córtex frontal de roedores e plaquetas no mesmo animal. Consistentemente com achados de culturas de células e cérebro (como discutido acima), a administração crônica de lítio reduziu significativamente os níveis de PKC alfa, fase membranosa, em córtex frontal e em plaquetas (Manji and Lenox, 1999). Além disso, houve uma correlação forte entre alterações induzidas por lítio nas membranas plaquetária e nas membranas de tecido cortical frontal em PKC alfa. Estes resultados sugerem que alterações induzidas pelo lítio em PKC alfa em plaquetas possam ser um modelo útil para se estudar alterações semelhantes no cérebro. No entanto, abordagens futuras que permitam medidas diretas de processos de transdução de sinais no cérebro humano *in vivo* devem ser desenvolvidos para possibilitar investigações ulteriores destes achados preliminares.

Como o nosso estudo envolveu um número relativamente pequeno de pacientes, os resultados relatados aqui devem ser vistos como preliminares. Estudos futuros em amostras maiores de pacientes bipolares devem tentar replicar estes achados preliminares e caracterizar com maiores detalhes os efeitos e curso da ação do lítio em processos mediados por PIP_2 e PKC, assim como investigar possível relação com resposta terapêutica.

Em conclusão, o estudo de mecanismos intracelulares de transdução de sinais em pacientes bipolares pode nos fornecer um melhor entendimento da fisiopatologia do transtorno e dos mecanismos de ação do lítio. Estas abordagens podem resultar, potencialmente, em novas intervenções farmacológicas para este transtorno psiquiátrico severo.

REFERÊNCIAS

- Baraban, J.M., Worley, P.F., Snyder, S.H., 1989. Second messenger systems and psychoactive drug action: Focus on the phosphoinositide system and lithium. *American Journal of Psychiatry* 146,1251-1260
- Bebchuk, J.M., Arfken, C.L., Dolan-Manji, S., Murphy, J., Manji, H.K., 1999. A Preliminary Investigation of a Protein Kinase C Inhibitor (Tamoxifen) in the Treatment of Acute Mania. *Archives of General Psychiatry* in press.
- Belmaker, R.H., Bersudsky, Y., Benjamin, J., Agam, G., Levine, J., Kofman, O., 1995. Manipulation of inositol-linked second messenger systems as a therapeutic strategy in psychiatry. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 49, 67-84
- Bitran, J.A., Manji, H.K., Potter, W.Z., Gusovsky, F., 1995. Down-regulation of PKC alpha by lithium in vitro. *Psychopharmacology Bulletin* 31, 449-52
- Brown, A.S., Mallinger, A.G., Renbaum, L.C., 1993. Elevated platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in bipolar mania. *American Journal of Psychiatry* 150, 1252-1254
- Casebolt, T.L., Jope, R.S., 1991. Effects of chronic lithium treatment on protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *Biol Psychiatry* 29, 233-43.
- Chen, G., Yuan, P.X., Jiang, Y., Huang, L.D., Manji, H.K., 1998. Lithium increases tyrosine hydroxylase levels both in vivo and in vitro. *Journal of Neurochemistry* 70, 1768-1771
- Friedman, E., Wang, H.Y., Levinson, D., Connell, T.A., Singh, H., 1993. Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biological Psychiatry* 33, 520-525

- Friedman, E., Markowitz, P.I., Undie, A.S., Connell, T., Wang, H.Y., 1995. Increased protein kinase C (PKC) activation in bipolar mania, NCDEU meeting. Orlando, Florida
- Hahn, C. G., and Friedman, E., 1999. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. *Bipolar Disorders* 2, 81-86
- Hudson, C.J., Young, L.T., Li, P.P., Warsh, J.J., 1993. CNS signal transduction in the pathophysiology and pharmacotherapy of affective disorders and schizophrenia. *Synapse* 13, 278-293
- Ishima, Y., Fujimagari, M., Masuzawa, Y., Waku, K., 1993. Inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation in brain of lithium-treated rats. *Lipids* 28, 577-81
- Jensen, J.B. and Mork, A., 1997. Altered protein phosphorylation in the rat brain following chronic lithium and carbamazepine treatments. *Eur Neuropsychopharmacol* 7(3), 173-9.
- Jope, R.S., Song, L., Li, P.P., et al., 1996. The phosphoinositide signal transduction system is impaired in bipolar affective disorder brain. *Journal of Neurochemistry* 66, 2402-2409
- Jope, R.S., 1999. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry* 4, 117-28.
- Lachman, H.M., Papolos, D.F., 1989. Abnormal signal transduction: a hypothetical model for bipolar affective disorder. *Life Sciences* 45, 1413-1426
- Lenox, R.H., Watson, D.G.J.P., Ellis, J., 1992. Chronic lithium administration alters a prominent PKC substrate in rat hippocampus. *Brain Res* 570, 333-340.
- Lenox, R.H., McNamara, R.K., Papke, R.L., Manji, H.K., 1998. Neurobiology of lithium: an update. *Journal of Clinical Psychiatry* 59, 37-47
- Lenox, R.H., Watson, D.G., 1994. Lithium and the brain: a psychopharmacological strategy to a molecular basis for manic depressive illness. *Clinical Chemistry* 40, 309-314

- Mallinger, A.G., Yao, J.K., Brown, A.S., Dippold, C.S., 1993. Analysis of complex mixtures of phospholipid classes from cell membranes using two-dimensional thin-layer chromatography and scanning laser densitometry. *Journal of Chromatography* 614, 67-75
- Manji, H.K., Bersudsky, Y., Chen, G., Belmaker, R.H., Potter, W.Z., 1996a. Modulation of protein kinase C isozymes and substrates by lithium: the role of myo-inositol. *Neuropsychopharmacology* 15, 370-81
- Manji, H.K., Chen, G., Hsiao, J.K., Risby, E.D., Masana, M.I., Potter, W.Z., 1996b. Regulation of signal transduction pathways by mood-stabilizing agents: implications for the delayed onset of therapeutic efficacy. *Journal of Clinical Psychiatry* 57 (Suppl 13), 34-46
- Manji, H.K., Etcheberrigaray, R., Chen, G., Olds, J.L., 1993. Lithium decreases membrane-associated protein kinase C in hippocampus: selectivity for the alpha isozyme. *Journal of Neurochemistry* 61, 2303-2310
- Manji, H.K., Lenox, R.H., 1994. Long-term action of lithium: A role for transcriptional and posttranscriptional factors regulated by protein kinase C. *Synapse* 16, 11-28
- Manji, H.K., Potter, W.Z., Lenox, R.H., 1995. Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Archives of General Psychiatry* 52, 531-543
- Manji, H.K., Lenox, R.H. Protein Kinase C Signaling in the Brain: Molecular Transduction of Mood Stabilization in the Treatment of Bipolar Disorder. 1999 Ziskind-Somerfeld Award Paper. *Biological Psychiatry*, in press.

- Molchan, S.E., Manji, H., Chen, G., et al., 1993. Effects of chronic lithium treatment on platelet PKC isozymes in Alzheimer's and elderly control subjects. *Neurosciences Letters* 162, 187-191
- Moore, G.J., Bebchuk, J.M., Parrish, J.K., Faulk, M.W., Arfken, C.L., Strahl-Bevacqua, J., and Manji, H.K. Temporal dissociation between lithium-induced CNS myo-inositol changes and clinical response in manic-depressive illness. *American Journal of Psychiatry*, in press.
- Pandey, G. N., Dwivedi, Y., Kumari, R., and Janicak, P. G., 1998. Protein kinase C in platelets of depressed patients. *Biol Psychiatry* 44, 909-11.
- Perez, J., Tardito, D., Mori, S., Racagni, G., Smeraldi, E., and Zanardi, R., 2000. Abnormalities of cAMP signaling in affective disorders: implications for pathophysiology and treatment. *Bipolar Disorders* 1, 27-36.
- Pletscher, A., 1986. Blood platelets as neuronal models: use and limitations. *Clinical Neuropharmacology* 9, 344-346
- Reisine, T., Zatz, M., 1987. Interactions between lithium, calcium, diacylglycerides and phorbol esters in the regulation of ACTH release from AtT-20 cells. *J Neurochem* 49, 884-889.
- Rotman, A., 1983. Blood platelets in psychopharmacological research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 7, 135-151
- Schreiber, G., Avissar, S., 1991. Lithium sensitive G protein hyperfunction: a dynamic model for the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Medical Hypotheses* 35, 237-243
- Sherman, W.R., Gish, B.G., Honchar, M.P., Munsell, L.Y., 1986. Effects of lithium on phosphoinositide metabolism in vivo. *Fed Proc* 45, 2639-46

- Sherman, W.R., Munsell, L.Y., Gish, B.G., Honchar, M.P., 1985. Effects of systemically administered lithium on phosphoinositide metabolism in rat brain, kidney, and testis. *J Neurochem* 44, 798-807
- Snyder, S.H., 1992. Second messengers and affective illness - Focus on the phosphoinositide cycle. *Pharmacopsychiatry* 25, 25-28
- Soares, J.C., Dippold, C.S., Mallinger, A.G., 1997. Platelet membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate alterations in bipolar disorder - Evidence from a single case study. *Psychiatry Research* 69, 197-202
- Soares, J.C., Dippold, C.S., Mallinger, A.G., Frank, E., Kupfer, D.J., 1999a. Platelet membrane phospholipids in euthymic bipolar disorder patients: Are they affected by lithium treatment? *Biological Psychiatry* 45, 453-457
- Soares, J.C., Mallinger, A.G., 1996. Abnormal phosphatidylinositol (PI)-signalling in bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 39, 461-462
- Soares, J.C., Mallinger, A.G.(in press): Intracellular signal transduction dysfunction in bipolar disorder. In Soares, J.C., Gershon, S. (eds), *Basic Mechanisms and Therapeutic Implications of Bipolar Disorder*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc.
- Soares, J.C., Mallinger, A.G., Dippold, C.S., Wells, K.F., Frank, E., Kupfer, D.J., 1999b. In vivo effects of lithium on membrane phosphoinositides in bipolar disorder patients. *Psychopharmacology*, submitted
- Soares, J.S., Mallinger, A.G., 1997. Intracellular phosphatidylinositol pathway abnormalities in bipolar disorder patients. *Psychopharmacology Bulletin* 33, 685-691
- Spitzer, R.L., Williams, J.B.W., Gibbon, M., et al., 1994. *Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID)*. Washington, D.C.: American Psychiatric Press

- Stahl, S.M., 1985. Peripheral models for the study of neurotransmitter receptors in man. *Psychopharmacology Bulletin* 21, 663-671
- Wachtel, H., 1989. Dysbalance of neuronal second messenger function in the aetiology of affective disorders: a pathophysiological concept hypothesizing defects beyond first messenger receptors. *Journal of Neural Transmission* 75, 21-29
- Wachtel, H., 1990. The second-messenger dysbalance hypothesis of affective disorders. *Pharmacopsychiatry* 23, 27-32
- Wang, H. Y., and Friedman, E., 1989. Lithium inhibition of protein kinase C activation-induced serotonin release. *Psychopharmacology* 99, 213-218.
- Wang, H.Y., Friedman, E., 1996. Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorder brains. *Biological Psychiatry* 40, 568-575
- Watson, D.G. and Lenox, R.H., 1996. Chronic lithium-induced down-regulation of MARCKS in immortalized hippocampal cells: potentiation by muscarinic receptor activation. *J Neurochem* 67, 767-777.
- Young, L. T., Wang, J. F., Woods, C. M., and Robb, J. C., 1999. Platelet protein kinase C alpha levels in drug-free and lithium-treated subjects with bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 40, 63-6.
- Zatz, M. and Reisine, T.D., 1985. Lithium induces corticotropin secretion and desensitization in cultured anterior pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1286-1290.
- Zhang, L., Elmer, L.W., Little, K.Y., 1998. Expression and regulation of the human dopamine transporter in a neuronal cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 59(1), 66-73.

Tabela 1 – Isoenzimas de proteína quinase C em pacientes bipolares tratados com lítio e voluntários normais

	Pacientes bipolares (n=9) (media±D.P.; mediana)	Voluntários normais (n=11) (media±D.P.; mediana)	Análise Estatística (testes t)
Alfa citosol	708±670; 556	1529±438; 1568	t=-3.24, d.f.=17, p=0.01*
Alfa membrana	1127±463; 1191	1145±663; 943	t=-0.07, d.f.=17, p=0.95
Beta I citosol	1942±1999; 1498	3043±888; 3117	t=-1.63, d.f.=17, p=0.12
Beta I membrana	1683±1025; 1639	1626±1027; 1281	t=0.12, d.f.=17, p=0.91
Beta II citosol	1578±1468; 1397	2711±798; 3023	t=-2.17, d.f.=17, p=0.05
Beta II membrana	2358±1053; 2100	2389±831; 2395	t=-0.07, d.f.=17, p=0.94
Delta citosol	1220±2359; 380	1432±1117; 938	t=-0.26, d.f.=17, p=0.80
Delta membrana	2598±1682; 2664	2417±1081; 2660	t=0.29, d.f. 17, p=0.78
Epsilon citosol	1070±862; 952	1575±966; 1442	t=-1.18, d.f.=17, p=0.26
Epsilon membrana	1812±1109; 2146	1566±1622; 1039	t=0.37, d.f.=17, p=0.72

Citosol=fração citosólica, membrana=fração de membrana. Os valores das isoenzimas de PKC estão expressos em unidades de densidade ótica normalizadas.

* Estatisticamente significativo no nível de significância $p < 0.05$.

A análise estatística foi realizada com testes t. Correção de Bonferroni não foi utilizada para a variável PKC alfa, fração citosólica, pois uma redução da mesma era parte da hipótese primária do nosso estudo, baseado em achados de estudos anteriores.

Figura 1 – Valores plaquetários de PKC alfa, fração citosólica, em pacientes bipolares tratados com o lítio e voluntários normais



Figura 1 - LEGENDA

A figura ilustra os valores plaquetários de proteína quinase C (PKC), isoenzima alfa (fração citosólica) em pacientes bipolares eutímicos tratados com o lítio e voluntários normais. Os valores estavam significativamente reduzidos em pacientes (teste $t=-3.24$, d.f.=17; $p=0.01$).

Figura 2 – Isoenzimas de PKC, frações citosólicas e de membrana

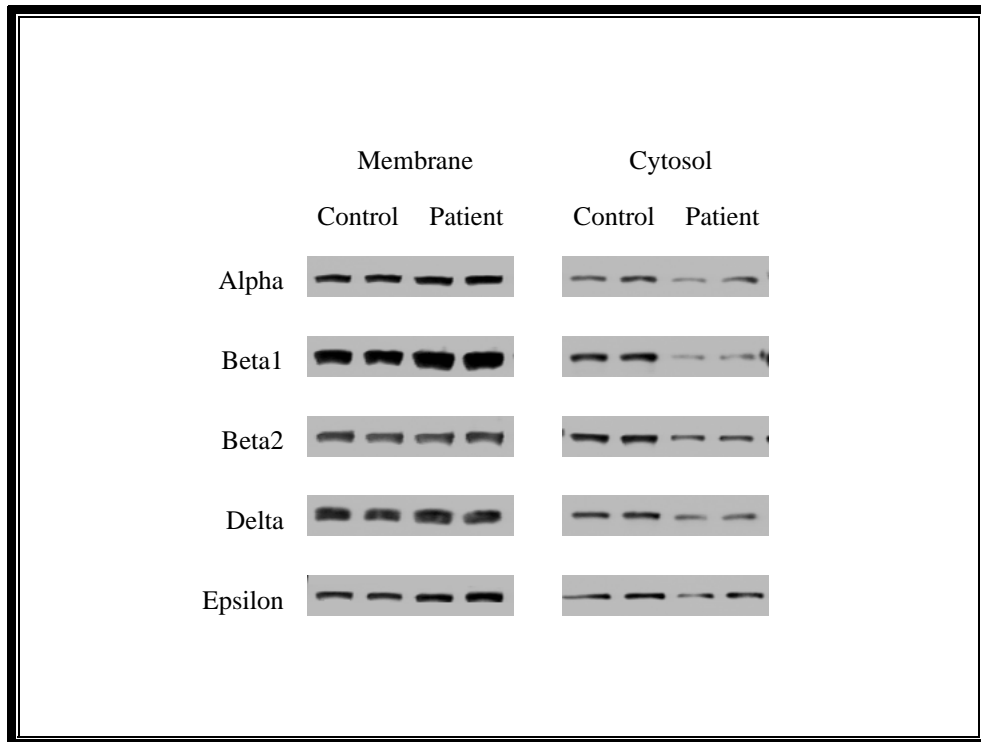


Figura 2 - LEGENDA

Esta figura ilustra um imunoblot com os valores de isoenzimas da proteína quinase C (PKC) em um paciente tratado com lítio e um voluntário normal. Ela ilustra nosso achado principal de redução da atividade de PKC alfa, fração citosólica, em pacientes tratados com lítio.

Figura 3 – Valores plaquetários de PKC alfa citosólica e PIP₂

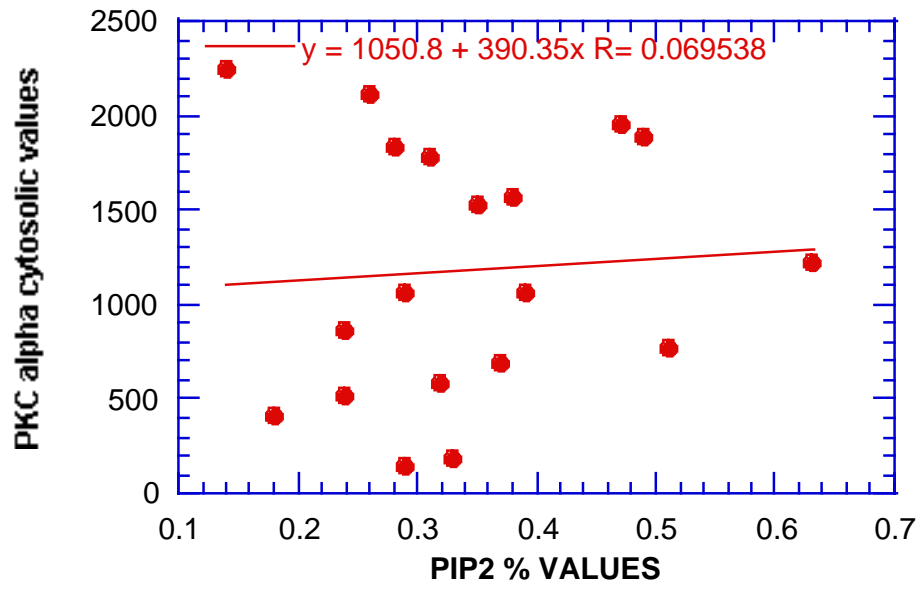


Figura 3 - LEGENDA

A figura ilustra os valores plaquetários da isoenzima alfa da proteína quinase C (fração citosólica) e do fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em pacientes bipolares eufímicos tratados com o lítio e voluntários normais. Não se encontrou nenhuma correlação estatisticamente significativa para a amostra total (n=19; Coeficiente de correlação de Pearson=0.070; p=0.777), ou no grupo de pacientes (n=8; Coeficiente de correlação de Pearson = -0.610; p=0.108) ou de voluntários normais (n=11; Coeficiente de correlação de Pearson = -0.352; p=0.289).