

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**DISFUNÇÃO NA RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETÍCULO  
ENDOPLASMÁTICO EM LINFÓCITOS DE PACIENTES  
COM TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR**

**BIANCA PFAFFENSELLER**

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Kapczinski

Porto Alegre, março de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**DISFUNÇÃO NA RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETÍCULO  
ENDOPLASMÁTICO EM LINFÓCITOS DE PACIENTES  
COM TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR**

**BIANCA PFAFFENSELLER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, março de 2012.

*... À minha família, em especial aos meus pais Eliseu e Mara  
e ao meu namorado Adriano pelo amor, compreensão e dedicação.*

*“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho  
mais certo de vencer é tentar mais uma vez”.*

(Thomas Edison)



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof Fábio Klamt, pela orientação, ensinamentos e dedicação a esta dissertação e à minha formação acadêmica.

Ao meu co-orientador, Prof Flávio Kapczinski, pela orientação e importante referência na área da pesquisa e pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Psiquiatria Molecular, particularmente ao pessoal da bancada: Gabriel, Bianca, Gabriela, Laura, Bruna, Carol e nossos queridos e sempre solícitos bolsistas de IC Pâmela, Giovana, Emily e André, com quem é muito bom compartilhar experiências e momentos divertidos no laboratório. Em especial, agradeço ao Biel, Bi, Gabi e Laura pelas constantes ajudas, trocas de idéias e interessantes discussões que contribuíram muito na conclusão deste trabalho. Valeu pela amizade, companheirismo e o apoio de sempre.

Ao Renan e Keila pelo auxílio e engajamento na coleta de pacientes. Agradeço também ao pessoal do ambulatório pela ajuda nas coletas e aplicação de protocolos clínicos, em especial ao Pedro Goi, Mirela, Miréia e Aroldo.

Ao pessoal do Banco de Sangue do HCPA pela simpatia e suporte nas coletas de controles.

Aos amigos e colegas do Departamento de Bioquímica, principalmente, à Fernanda, Leo e Francis, que me auxiliaram no aprendizado e discussão de técnicas.

Às minhas grandes amigas Bianca e Roberta pela amizade e parceria constante.

Ao Adriano pela companhia, amor e carinho. Muito obrigada por me apoiar e compreender as minhas ausências e preocupações. Te amo!

À minha família, pela paciência, confiança e compreensão em todos os momentos desta trajetória, principalmente naqueles em que estive mais ausente. Agradeço por tudo!

## ÍNDICE

### **PARTE I**

<i>RESUMO</i> .....	2
<i>ABSTRACT</i> .....	3
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i> .....	4
<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	6
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
1.1 Transtorno de Humor Bipolar .....	7
1.2 Estadiamento do THB .....	8
1.3 Fisiopatologia do THB .....	10
1.4 Estresse do RE.....	13
1.5 Estresse do Retículo Endoplasmático e THB.....	22
1.6 Cultura de Linfócitos para estudo do THB .....	23
1.7 Justificativa.....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 Objetivo Geral .....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
<b>3. RESULTADOS</b> .....	28
3.1 Capítulo I.....	28
<i>Impaired endoplasmic reticulum stress response in lymphocytes from patients with bipolar disorder</i> .....	28
Abstract .....	31
Introduction .....	32
Methods and Materials .....	35
Results .....	39
Discussion .....	42
Acknowledgements .....	48
Financial disclosures .....	48
References .....	49
Figure Legends .....	58
Table 1. Characteristics of the BD and control groups .....	60
Table 2. Clinical features of 20 euthymic patients in the early and late stages of BD.....	61
Figure 1. ER stress response in lymphocytes from BD patients and controls. ....	62

Figure 2. ER stress response in lymphocytes from euthymic patients according to stages of disorder.....	63
Figure 3. Effect of lithium on ER stress response in lymphocytes from BD patients and controls.....	64
4. <i>DISCUSSÃO</i> .....	66
5. <i>CONCLUSÕES</i> .....	77
6. <i>REFERÊNCIAS</i> .....	78
<i>ANEXO A</i> .....	95
Instruções para a submissão de manuscritos na revista <i>Biological Psychiatry</i> .....	95
<i>ANEXO B</i> .....	113
Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. ....	113
<i>ANEXO C</i> .....	115
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para Controles e Pacientes.....	115
<i>ANEXO D</i> .....	120
Protocolos aplicados no recrutamento de Controles e Pacientes para o projeto. ....	120

# **PARTE I**

## RESUMO

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é uma doença psiquiátrica crônica e grave que tem sido relacionada com várias disfunções celulares, tais como uma resposta prejudicada ao estresse do retículo endoplasmático (RE). O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta ao estresse do RE (Unfolded Protein Response - UPR) e a morte celular induzida por este processo celular em linfócitos de pacientes com THB e indivíduos saudáveis, avaliando sua relação com os estágios da doença. Linfócitos de 30 pacientes bipolares e 32 controles pareados por sexo e idade foram tratados com tunicamicina, um indutor do estresse do RE, por 12h ou 24h, com o objetivo de mensurar os níveis de proteínas relacionadas à UPR (GRP78, eIF2 $\alpha$ -P e CHOP) por citometria de fluxo, e por 48h para analisar a morte celular induzida pelo estresse do RE. O efeito de lítio sobre estes parâmetros na cultura celular também foi avaliado. No grupo controle, observamos a indução de GRP78 e eIF2 $\alpha$ -P pela tunicamicina após 12h e 24h e de CHOP após 24h. O aumento induzido por tunicamicina dos níveis de proteínas relacionadas com a UPR não foram encontrados no grupo de pacientes. Entre os pacientes eutímicos, aqueles em estágio inicial da doença tiveram uma melhor resposta ao estresse do RE quando comparados aos pacientes em estágios avançados, apresentando níveis de GRP78 e eIF2 $\alpha$ -P semelhantes aos controles após 12h de tratamento com tunicamicina. A morte celular induzida por tunicamicina foi maior nos pacientes bipolares em relação aos controles. O lítio não induziu diferenças na expressão das proteínas avaliadas e não reverteu a morte celular induzida pelo estresse do RE, entretanto levou a uma diminuição pequena, mas estatisticamente significativa, neste último parâmetro. Este estudo em cultura primária de linfócitos de pacientes bipolares reforça os resultados anteriores sobre a disfunção na resposta ao estresse do RE no THB. Essa disfunção no RE pode estar associada com a diminuição da resiliência celular nos pacientes, contribuindo, em última análise, para a progressão da doença.

## ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a severe chronic psychiatric disorder that has been related to several cellular dysfunctions, such as an impaired endoplasmic reticulum (ER) stress response. We aimed to evaluate the unfolded protein response (UPR) and the outcome of this cellular process in cultured lymphocytes from patients with BD and healthy subjects, assessing its relationship to the stage of the disorder. Lymphocytes from 30 BD patients and 32 age- and sex-matched controls were treated with tunicamycin, an ER stressor, for 12h or 24h in order to measure levels of UPR-related proteins (GRP78, eIF2 $\alpha$ -P and CHOP) by flow cytometry, and for 48h to analyze ER stress-induced cell death. The effect of lithium on these parameters in cultured lymphocytes was also evaluated. In the control group, inductions of GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P by tunicamycin after 12h and 24h and of CHOP after 24h were observed. Tunicamycin-induced increases in UPR-related proteins were not found in the BD group. Among euthymic patients, those at an early stage of disorder had a better response to ER stress when compared to patients in advanced stages, with GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P levels similar to controls after 12h of treatment with tunicamycin. Tunicamycin-induced cell death was higher in BD patients compared to controls. Lithium did not induce differences in the expression of the evaluated proteins and did not reverse tunicamycin-induced cell death, but led to a small yet statistically significant decrease in this parameter. This study extends earlier findings about impaired ER stress response in primary cultures of lymphocytes from BD patients. ER dysfunction may be associated with decreased cellular resilience in BD, ultimately contributing to the progression of the disorder.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALG9	Glicosilação ligada ao resíduo asparagina 9 (do inglês, <i>asparagine-linked glycosylation 9</i> )
ASK1	Cinase regulada por sinal apoptótico-1 (do inglês, <i>apoptosis signal regulating kinase 1</i> )
ATF4	Fator de ativação de transcrição 4 (do inglês, <i>activating transcription factor 4</i> )
ATF6	Fator de ativação de transcrição 6 (do inglês, <i>activating transcription factor 6</i> )
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês, <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
BiP	<i>Binding immunoglobulin Protein</i>
CHOP	Proteína homóloga C/EBP (do inglês, <i>C/EBP homologous protein</i> )
DSM-IV	Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais IV
EBV	Vírus Epstein-Barr
eIF2	Fator de iniciação eucariótico 2 (do inglês, <i>eukaryotic initiation factor 2</i> )
ERSE	Elemento responsivo ao estresse do retículo endoplasmático (do inglês, <i>endoplasmatic reticulum stress response element</i> )
GADD153	Gene de parada de crescimento e indução de dano ao DNA 153 (do inglês, <i>growth-arrest and DNA-damage-inducible gene 153</i> )
GADD34	Gene de parada de crescimento e indução de dano ao DNA 34 (do inglês, <i>growth-arrest and DNA damage-inducible 34</i> )
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia (do inglês, <i>glial-derived neurotrophic factor</i> )
GRP78	Proteína Regulada por Glicose de 78 kDa (do inglês, <i>glucose-regulated protein of 78 kDa</i> )
GRP94	Proteína Regulada por Glicose de 94kDa (do inglês, <i>glucose-regulated protein of 94 kDa</i> )
IL-6/10	Interleucina 6/10
IRE 1	Cinase que requer inositol - 1 (do inglês, <i>inositol requiring kinase 1</i> )
JIK	Cinase inibitória c-Jun N-terminal (do inglês, <i>c-Jun NH2-terminal</i> )

	<i>inhibitory kinase)</i>
JNK	Cinase c-Jun N-terminal (do inglês, <i>c-Jun NH2-terminal kinase</i> )
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, <i>major histocompatibility complex</i> )
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
OMS	Organização Mundial da Saúde
PERK	<i>double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase</i>
PP1C	<i>Catalytic Protein Phosphatase 1</i>
RE	Retículo Endoplasmático
S100B	Proteína de ligação ao cálcio, da família S100 (do inglês, <i>S100 calcium binding protein B</i> )
SNC	Sistema Nervoso Central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )
THB	Transtorno de Humor Bipolar
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>tumor necrosis factor- alpha</i> )
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAP	Potencial antioxidante não enzimático total (do inglês, <i>total reactive antioxidant potential</i> )
UPR	Resposta a proteínas mal-enoveladas (do inglês, <i>unfolded protein response</i> )
XBP1	<i>X-box binding protein</i>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vias de transdução do sinal ativadas pelo estresse do RE.....	15
<b>Figura 2.</b> Via da PERK.....	17
<b>Figura 3.</b> Vias apoptóticas reguladas pela UPR.....	20
<b>Figura 4.</b> Remodelamento cerebral após vários episódios de humor e estresse recorrente.....	73

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Transtorno de Humor Bipolar

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é uma doença crônica e grave, que afeta aproximadamente 2,4 % da população mundial (Merikangas et al., 2011) e está associada a episódios recorrentes e elevada morbidade clínica (Kupfer, 2005). Este transtorno mental também está associado a altos índices de suicídio e desemprego (Belmaker, 2004; Kupfer, 2005) e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é considerado uma das dez principais causas de incapacitação no mundo (Lopez and Murray, 1998).

O curso clínico do THB é crônico, geralmente caracterizado por episódios agudos (mania ou depressão), quando há uma exacerbação dos sintomas, e por períodos subsindrômicos e de remissão (denominados eutímia). O diagnóstico do THB é realizado a partir da ocorrência de pelo menos um episódio maníaco ou hipomaníaco durante a vida, sendo que a presença de episódio maníaco confere o diagnóstico de THB tipo I, enquanto a presença de episódio hipomaníaco confere o diagnóstico de THB tipo II (Belmaker, 2004). Ambos apresentam sintomas que envolvem alterações no humor, cognição e comportamento. A intensidade dos sintomas é variável, acarretando prejuízos no desempenho das atividades diárias e em sofrimento pessoal (Vieta et al., 1999).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), o episódio de mania é caracterizado por uma elevação de humor ou euforia, expansivo ou irritável, com duração de no mínimo uma semana (e nos casos que requerem a hospitalização, independente da duração do episódio) associado ao menos a três dos seguintes critérios (quatro, se humor irritável): redução da necessidade de sono, distraibilidade, grandiosidade, pressão de fala e taquilalia, fuga de idéias, agitação psicomotora, comportamento excessivo voltado para atividades prazerosas com grande potencial para conseqüências dolorosas. A alteração de humor é suficientemente grave a ponto de causar prejuízo tanto no âmbito

ocupacional quanto social do indivíduo e os sintomas não devem ser consequência de efeitos fisiológicos ou de uma condição médica geral (American Psychiatry Association, 2000).

A intensidade, o tipo e a cronicidade desses sintomas determinam a subdivisão do diagnóstico entre mania e hipomania. Na hipomania, as alterações são mais moderadas, não há presença de sintomas psicóticos ou sintomas que possam causar dano ou colocar em perigo a vida de um indivíduo ou a do próprio paciente. O episódio hipomaniaco apresenta uma duração mínima de quatro dias.

Os episódios de depressão, no THB, caracterizam-se por humor deprimido, perda de interesse, retardo psicomotor, alterações no apetite e sono, redução da velocidade de pensamento e fala, baixa autoestima e ideação suicida (Belmaker, 2004). A gravidade dos sintomas pode variar consideravelmente, da mesma forma que os episódios de mania. O período entre episódios, quando há remissão dos sintomas e o paciente apresenta humor estável, é chamado de eutímia.

Em virtude de seu curso crônico e à freqüente reincidência e gravidade dos sintomas de humor, o tratamento do THB atualmente é baseado no manejo dos episódios agudos e no tratamento de manutenção para prevenir a ocorrência de novos episódios (Yatham et al., 2005). Os fármacos disponíveis para o tratamento do THB incluem o lítio (estabilizador de humor mais comumente utilizado), a carbamazepina, o ácido valpróico, e também, lamotrigina, topiramato, gabapentina e antipsicóticos atípicos (Keck et al., 1998).

## **1.2 Estadiamento do THB**

Estudos têm mostrado que o prognóstico a longo prazo do THB é muito pior do que aquele observado anteriormente. Os pacientes frequentemente podem apresentar sintomas subsindrômicos associados a prejuízos cognitivos e declínio funcional decorrentes da progressão do transtorno (Kapczinski et al., 2008). Há evidências mostrando que os pacientes em estágios iniciais da doença apresentam desfechos clínicos muito melhores do que aqueles

com múltiplos episódios (Schuepbach et al., 2008; Tohen et al., 1990). Por exemplo, pacientes com maior tempo de doença ou aqueles que tiveram mais de três episódios possuem uma resposta menor ao tratamento, particularmente ao lítio (Gelenberg et al., 1989; Swann et al., 1999). Além disso, a duração dos períodos entre episódios diminui à medida que o número de episódios aumenta (Kessing et al., 1998). Com base nestas observações, um modelo de estadiamento tem sido proposto para o THB (Berk et al., 2007; Kapczinski et al., 2009a; Kapczinski et al., 2009b; Vieta et al., 2011), considerando variáveis clínicas, análise de comorbidades, cognição e biomarcadores no período de remissão.

Essas observações clínicas são consistentes com estudos que relataram diferenças anatômicas em estruturas cerebrais e na função cognitiva entre pacientes em estágio inicial e avançado da doença. As mudanças neuroanatômicas tendem a ser mais pronunciadas após repetidos episódios e correlacionam-se positivamente com o tempo de duração da doença (Lyo et al., 2006; Strakowski et al., 2002). Além disso, pacientes com apenas um episódio maníaco apresentam mínimas alterações em estruturas cerebrais (Yatham et al., 2007) e menor extensão de prejuízos cognitivos em comparação àqueles com múltiplos episódios (Torres et al., 2007). Outros estudos verificaram diferenças nos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios e da neurotrofina BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) (Kauer-Sant'Anna et al., 2009) e de alguns parâmetros de estresse oxidativo (Andreazza et al., 2009) em decorrência da evolução da doença.

Assim, verifica-se que o THB leva ao acometimento gradual do cérebro e da saúde geral do paciente, através de um processo degenerativo no tecido nervoso e periférico, o qual é episódio-dependente (Kapczinski et al., 2008). Essa *neuroprogressão* da doença pode contribuir com as altas taxas de comorbidades encontradas nos pacientes com THB, as quais chegam a mais de 60% ao longo da vida (Sasson et al., 2003), tais como doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes melitus (Kupfer, 2005), o que está diretamente associado ao aumento da morbidade e mortalidade observadas neste transtorno.

O modelo de estadiamento para o THB proposto por Kapczinski e colaboradores (2009a) enfatiza o potencial uso de biomarcadores para diferenciar pacientes em estágios precoces e tardios do transtorno no período inter-episódico. Este modelo inclui uma fase latente: pacientes com "ultra-alto risco" para o desenvolvimento de THB, caracterizada por uma história familiar de THB, traços no temperamento, humor e sintomas de ansiedade assim como vulnerabilidade genética para desenvolver o transtorno; Estágio I: pacientes que retornam ao seu nível basal de funcionamento quando os episódios de humor são estabilizados; Estágio II: biomarcadores e prejuízo funcional estão relacionados à presença de comorbidades ou da presença de ciclagem rápida entre episódios; Estágio III: comprometimento cognitivo e funcional persistente no período inter-episódico, bem como alterações em biomarcadores; e estágio IV: mesmas características do Estágio III associadas com prejuízo cognitivo e funcional extremo, de modo que os pacientes são incapazes de viver autonomamente. No presente trabalho, foram recrutados pacientes eutímicos nestes quatro estágios, sendo que os pacientes em estágios I e II foram considerados em fase inicial e pacientes em estágios III e IV classificados como estágio tardio da doença.

### **1.3 Fisiopatologia do THB**

Apesar dos avanços obtidos nas pesquisas sobre o THB, sua fisiopatologia ainda não está completamente esclarecida. Sabe-se que vários fatores podem estar envolvidos no mecanismo da doença, incluindo fatores genéticos e epigenéticos, fatores bioquímicos, vias de sinalização neuro-humorais, sinalização através de fatores neurotróficos, alterações no sistema imune, estresse oxidativo, regulação da expressão gênica, entre outros (Berk et al., 2011; Kapczinski et al., 2008).

Entre as bases moleculares do THB, é possível observar que o transtorno resulta de um conjunto de interações complexas entre os diversos genes que levam a uma maior suscetibilidade à doença e entre estes genes e os fatores ambientais, como estresse e eventos

traumáticos (Barnett e Smoller, 2009; Caspi e Moffitt, 2006). Segundo estudos genéticos, o risco de um indivíduo desenvolver o THB é aproximadamente 10 vezes maior em pessoas que possuem familiar em primeiro grau com o diagnóstico da doença do que na população em geral. Além disso, cerca de 70% de gêmeos monozigóticos são concordantes para o THB, enquanto que esta concordância reduz para apenas 30% entre gêmeos dizigóticos (Kelsoe, 2003). Esses achados demonstram a importância dos fatores genéticos na fisiopatologia deste transtorno. Apesar do THB apresentar um elevado padrão de herdabilidade, a maioria das pesquisas que procuram por genes de suscetibilidade, através de estudos de genes únicos, apresenta resultados negativos, o que pode ser decorrente de uma falta de homogeneidade clínica, baixo risco relativo de cada gene e/ou uma contribuição de múltiplas mutações raras (Barnett e Smoller, 2009).

Através de estudos neuroanatômicos e neurofuncionais, é possível observar alterações estruturais e funcionais em regiões específicas do cérebro de pacientes bipolares, como córtex pré-frontal e estruturas subcorticais e mediais, envolvidas na modulação do comportamento (Strakowski et al., 2005). Verifica-se, por exemplo, a presença de alterações no volume de regiões cerebrais específicas acompanhadas de atrofia ou perda celular (Hajek et al., 2005) e volumes reduzidos de substância cinzenta em áreas do córtex orbital e pré-frontal medial, estriado ventral e hipocampo, assim como uma dilatação significativa do terceiro ventrículo em comparação com controles saudáveis (Beyer e Krishnan, 2002). Estudos *post-mortem* complementares mostraram reduções anormais no volume cortical, redução na contagem de células gliais e/ou no tamanho dos neurônios do córtex pré-frontal subgenuar, córtex orbital, córtex pré-frontal ântero-lateral e amígdala (Deep-Soboslay et al., 2008). Ainda não está bem estabelecido se essas alterações são causadas por uma disfunção no desenvolvimento que conferem susceptibilidade a transtornos psiquiátricos, se são mudanças compensatórias a processos patogênicos ou conseqüências dos próprios episódios de humor e curso da doença.

Estudos bioquímicos, a partir de tecidos do Sistema Nervoso Central (SNC) de animais ou de amostras periféricas de pacientes, têm sido ferramentas importantes no esclarecimento da fisiopatologia do THB, sendo que várias moléculas parecem estar envolvidas especialmente nos episódios agudos, com níveis geralmente normais durante a eutímia. Entre elas, pode-se destacar o papel das neurotrofinas, as quais estão envolvidas no desenvolvimento, sobrevivência e plasticidade neuronal (Huang e Reichardt, 2001). Os níveis de BDNF encontram-se diminuídos periféricamente em pacientes bipolares nos episódios maníacos e depressivos (Cunha et al., 2006). Já a neurotrofina-3 (NT-3) (Walz et al., 2007) e a neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Walz et al., 2009) têm seus níveis aumentados no soro de pacientes bipolares em episódio agudo, de forma semelhante ao que ocorre com o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Rosa et al., 2012). Além das neurotrofinas, outros marcadores biológicos têm sido analisados no THB, como a proteína marcadora de resposta glial S100B (Andreazza et al., 2007a), a proteína C-reativa (Cunha et al., 2008), citocinas pró e antiinflamatórias, marcadores de dano oxidativo e dano ao DNA (Andreazza et al., 2008), entre outros.

Estas evidências sugerem que marcadores periféricos relacionados ao estresse oxidativo, inflamação e neurotrofinas podem estar alterados durante os episódios de humor no THB. Entretanto, geralmente estes dados são obtidos isoladamente. Um estudo recente, então, avaliou os níveis séricos de BDNF, NT-3, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, TBARS, Carbonil e TRAP em pacientes bipolares em diferentes estados de humor, comparados a indivíduos saudáveis, para estudar a correlação e interação destes parâmetros (Kapczinski et al., 2011). Para comparação, indivíduos com sepse foram utilizados como controle positivo. Este trabalho verificou várias diferenças entre os pacientes com THB e controles, sugerindo o potencial uso destes marcadores para avaliar a toxicidade sistêmica ou atividade da doença.

Assim, o THB afeta o organismo de forma sistêmica, causando alterações bioquímicas que podem ser avaliadas tanto no SNC como na periferia. Há evidências de que disfunções de

várias vias de sinalização intracelular afetam a resiliência celular no THB. Entre elas, por exemplo, estão os estudos com células do sangue periférico, que verificaram níveis aumentados de cálcio em plaquetas, linfócitos e células linfoblastóides de pacientes bipolares (Warsh et al., 2004), demonstrando uma desregulação na dinâmica do cálcio. Um estudo com neuroepitélio olfatório verificou que as células derivadas dos pacientes eram mais vulneráveis à morte celular (McCurdy et al., 2006). Possivelmente, a integridade de neurônios destes pacientes também está prejudicada, considerando que níveis de N-acetilaspártato no cérebro estão diminuídos no THB (Stork e Renshaw, 2005).

Estes achados sugerem que os pacientes bipolares apresentam uma vulnerabilidade celular ou resiliência celular comprometida (Kato, 2008; Shaltiel et al., 2007). Entretanto, não está estabelecido os mecanismos responsáveis por estas disfunções celulares no THB, se é devido a um defeito celular específico ou alterações nas funções de determinadas organelas envolvidas com a manutenção da resiliência celular, como a mitocôndria e o retículo endoplasmático. Há várias evidências que sugerem o envolvimento do retículo endoplasmático (RE) na fisiopatologia e tratamento do THB, como: o tratamento crônico com lítio regula a expressão de Bax e Bcl-2, as quais exercem efeitos opostos na sinalização do cálcio no RE (Chami et al., 2004; Chen et al., 2000); o tratamento crônico com valproato e lítio aumenta a expressão de chaperonas do RE, como a GRP78/BiP, GRP94 e calreticulina (Bown et al., 2002; Shao et al., 2006); a mefloquina, uma droga antimalárica conhecida por causar disfunção no RE, induz mania em indivíduos vulneráveis (Dow et al., 2005).

#### **1.4 Estresse do RE**

Além do papel na sinalização e estoque de cálcio e na síntese de esteróis e lipídios, o Retículo Endoplasmático (RE) é responsável pela síntese, enovelamento e modificações pós-traducionais de proteínas secretórias e de superfície celular que se destinam para a célula ou para o meio extracelular, sendo a primeira organela na via secretória das células eucarióticas



(Rutkowski e Kaufman, 2004). Neste processo, proteínas mal enoveladas não são exportadas para o Complexo de Golgi e ficam retidas no RE para o correto enovelamento ou são marcadas para a degradação (Schroder e Kaufman, 2005). Em situações em que ocorrem perturbações no lúmen do RE, como alterações no estado redox, na homeostase do cálcio ou defeitos nas modificações pós-traducionais, a função desta organela é comprometida e ocorre o acúmulo de proteínas mal enoveladas. Essa condição é conhecida como *Estresse do Retículo Endoplasmático* (Lai et al., 2007; Walter e Ron, 2011).

A resposta celular a esta condição (*Unfolded Protein Response - UPR*) é uma das respostas adaptativas na qual as células ativam mecanismos de proteção para restabelecer a homeostase no lúmen do RE (Kimata e Kohno, 2011; Lai et al., 2007), através de alguns mecanismos:

- *indução de chaperonas do RE*, como a GRP78, GRP94 e a calreticulina, as quais promovem o enovelamento das proteínas mal enoveladas;

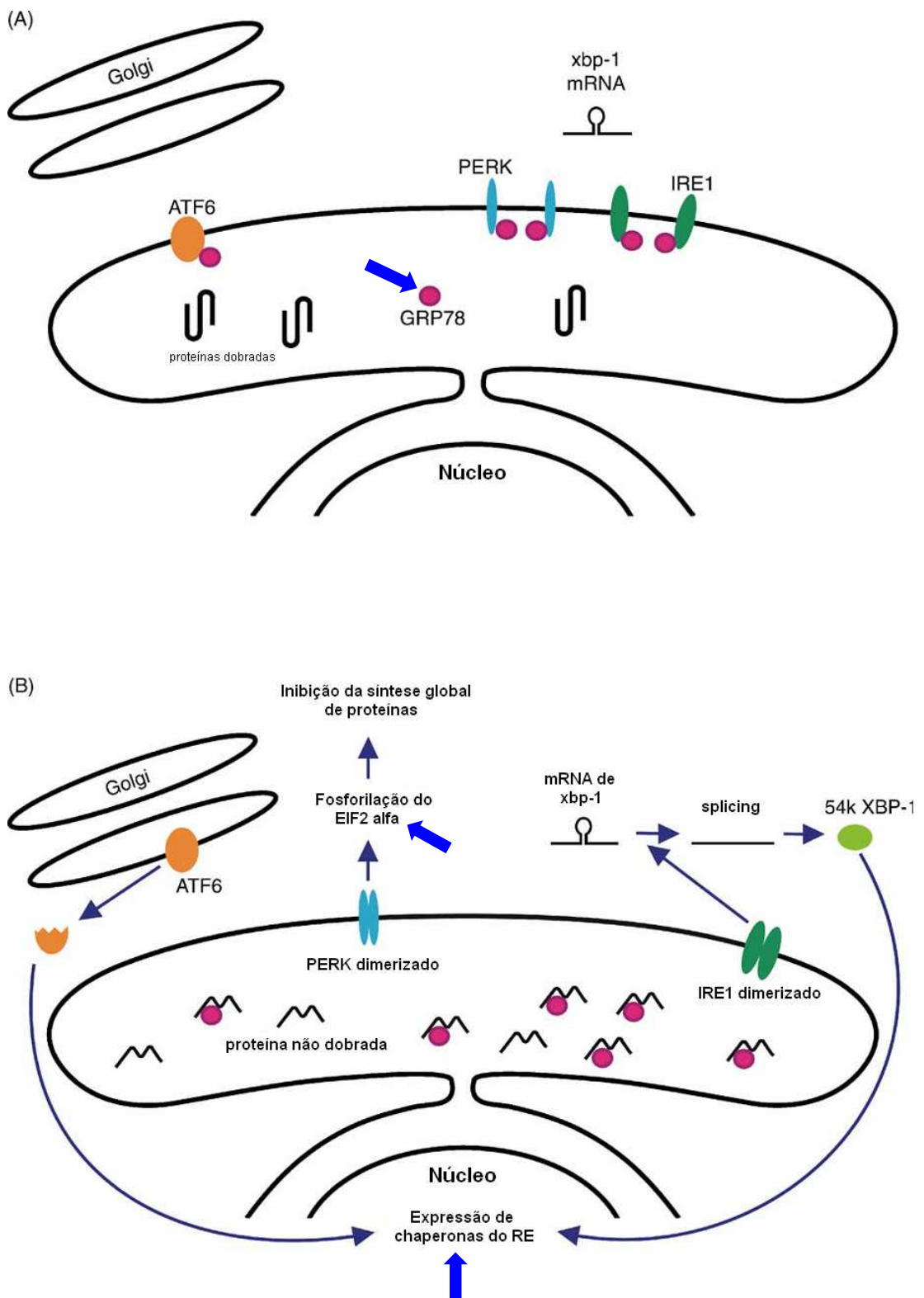
- *inibição da síntese protéica*;

- *indução da via de degradação protéica relacionada ao RE*, em que as proteínas mal enoveladas são sinalizadas para não prosseguirem ao longo da via de secreção e são transportadas para o citoplasma, onde sofrem proteólise pelo sistema do proteossoma (Schroder e Kaufman, 2005).

- *indução de apoptose*, se o estresse do RE for intenso e crônico e a UPR não for suficiente para restabelecer o equilíbrio.

A UPR consiste em três vias de sinalização principais, que atuam em paralelo e com mecanismos únicos de transdução de sinal. Estas vias são definidas por três classes de proteínas transmembrana do RE (Figura 1): IRE1 (*inositol requiring kinase 1*), PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like RE kinase*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*). Elas funcionam como um tipo de sensor da presença de um estresse no lúmen da organela e são ativadas quando ocorre sua dissociação da chaperona GRP78

(Kimata e Kohno, 2011; Lai et al., 2007). A proteína GRP78 (*glucose-regulated protein of 78 kDa*), a qual é tradicionalmente considerada como a principal chaperona do RE, desempenha muitas funções na célula, como o enovelamento de proteínas, controle de qualidade do processamento proteico no RE, ligação ao cálcio, papel anti-apoptótico e regulação da sinalização da UPR (Ni et al., 2011; Rao et al., 2002). Assim, esta chaperona contribui para muitos processos relacionados à sobrevivência celular, sendo altamente regulada em resposta ao estresse do RE.



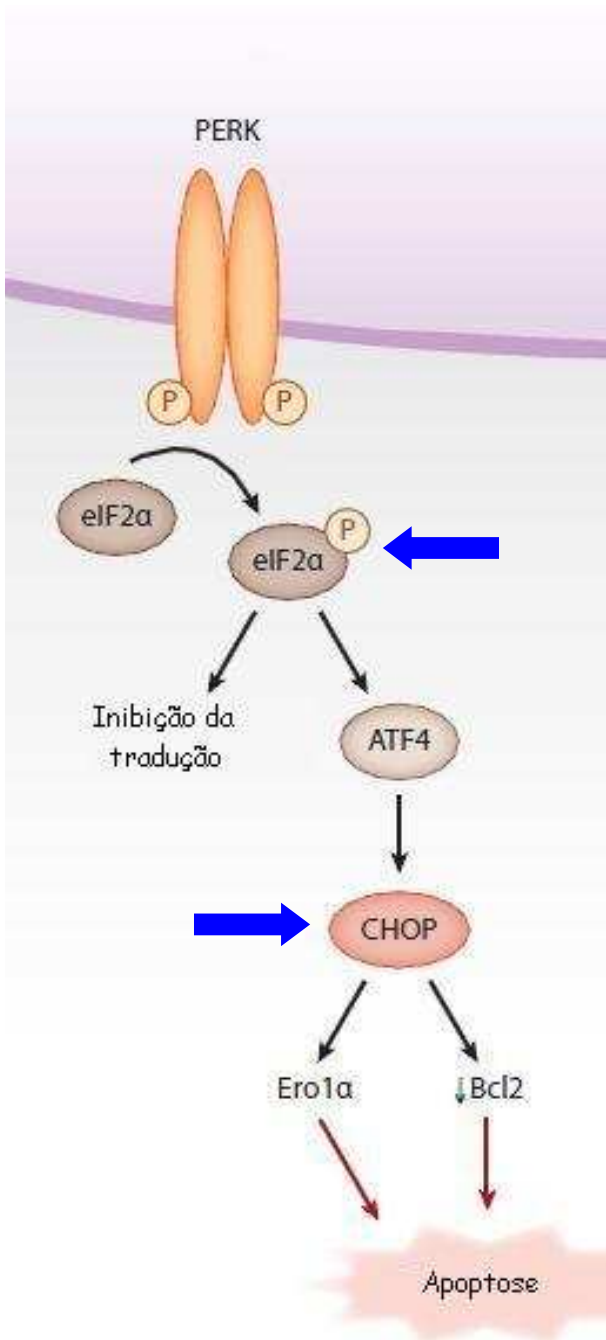
**Figura 1. Vias de transdução do sinal ativadas pelo estresse do RE.** (A) Em condições de equilíbrio no lúmen do RE, quando a capacidade de enovelamento e processamento protéico se mantém de acordo com a síntese de polipeptídeos, a chaperona GRP78 está associada com as proteínas transmembranas do RE (ATF6, PERK e IRE1), resultando na supressão da atividade enzimática destas proteínas. (B) Em condições de estresse do RE, quando a quantidade de proteínas mal enoveladas excede os níveis de GRP78 livre no lúmen do RE,

esta chaperona se dissocia de ATF6, PERK e IRE1 para aumentar a capacidade de enovelamento. A dissociação de GRP78 de PERK e IRE1 leva a oligomerização, autofosforilação e ativação destas proteínas. Quando ativada, PERK fosforila a subunidade  $\alpha$  de eIF2, resultando na inibição global da síntese protéica, enquanto IRE1 ativada cliva um mRNA que codifica um fator de transcrição específico da UPR, XBP1, aumentando a atividade transcricional de genes alvos da UPR. Já ATF6, depois da dissociação de GRP78, se transloca para o Complexo de Golgi onde é clivado por proteases para formar o fator de transcrição ativo que induz a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse do RE, incluindo GRP78 (adaptado de Paschen e Mengesdorf, 2005). Setas em azul indicam alguns parâmetros que serão avaliados nesta dissertação.

Nos mamíferos, a primeira via a ser ativada em situações de estresse no RE é a diminuição temporária da síntese protéica global, mediada pela sinalização da **PERK** (Figura 2). A PERK é uma proteína cinase transmembrana do RE, associada com a GRP78 em condições de equilíbrio. Com o acúmulo de proteínas no RE, GRP78 se dissocia de PERK, permitindo sua dimerização e autofosforilação (Bertolotti et al., 2000; Harding et al., 1999). Quando ativada, PERK fosforila o aminoácido serina-51 da subunidade  $\alpha$  da proteína eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*), inibindo eIF2 $\alpha$  e assim, a tradução de mRNA (Harding et al., 1999).

Neste sentido, a via da PERK contribui para a redução do fluxo de proteínas no RE, aliviando o estresse. Entretanto, alguns mRNAs contendo fases abertas de leitura em regiões não traduzidas são preferencialmente traduzidos quando eIF2 $\alpha$  é limitado. Um destes mRNAs codifica o fator de transcrição ATF4. Dois genes alvos de ATF4 importantes são CHOP (*transcription factor C/EBP homologous protein*) e GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*) (Walter e Ron, 2011). CHOP é um fator de transcrição que controla genes que codificam componentes envolvidos na apoptose. Assim, a via da PERK contribui para a proteção na UPR, mas também pode ativar sinais de vias de morte celular programada. Provavelmente, esta ação dual de PERK é influenciada pelos níveis de eIF2 $\alpha$  fosforilado, o que pode ser demonstrado pelos efeitos de suas fosfatases específicas (Walter e Ron, 2011).

GADD34, outro gene alvo de ATF4, codifica uma subunidade da proteína fosfatase PP1C que neutraliza PERK pela desfosforilação de eIF2 $\alpha$ . A inibição do complexo GADD34-PP1C protege as células contra o estresse do RE, prolongando os níveis de eIF2 $\alpha$  fosforilado (Marciniak et al., 2004; Tsaytler et al., 2011). Mas, a deleção da fosfatase constitutiva de eIF2 $\alpha$  causa efeitos letais (Harding et al., 2009; Tsaytler et al., 2011), mostrando a importância da regulação balanceada da desfosforilação de eIF2 $\alpha$ .



**Figura 2. Via da PERK.** Quando ativada, PERK fosforila o aminoácido serina-51 da subunidade  $\alpha$  da proteína eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*), inibindo eIF2 $\alpha$  e assim, a tradução de mRNA. Assim, a via da PERK contribui para a redução do fluxo de proteínas no RE, aliviando o estresse. Entretanto, alguns mRNAs contendo fases abertas de leitura em regiões não traduzidas são preferencialmente traduzidos quando eIF2 $\alpha$  é limitado. Um destes mRNAs codifica o fator de transcrição ATF4, o qual regula CHOP (*transcription factor C/EBP homologous protein*). CHOP é um fator de transcrição que controla genes que codificam componentes envolvidos na apoptose. Assim, a via da PERK contribui para a proteção na UPR, mas também pode ativar sinais de vias de morte celular programada (adaptado de Ozcan e Tabas, 2012). Setas em azul indicam alguns parâmetros que serão avaliados nesta dissertação.

**ATF6** é um fator de transcrição que é inicialmente sintetizado como uma proteína transmembrana do RE. Quando há um acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, esta proteína é transportada para o Complexo de Golgi, onde é clivada por proteases, que removem o domínio luminal e a porção transmembrana, produzindo um domínio citoplasmático livre, o qual é um fator de transcrição ativo. Este fator de transcrição, então, se transloca para o núcleo, onde se liga à região promotora ERSE (*ER stress response elements*), resultando na ativação de genes alvo da UPR, incluindo os genes que transcrevem as chaperonas (Lai et al., 2007; Walter e Ron, 2011). O domínio luminal de ATF6, além de interagir com a GRP78, contém pontes dissulfeto intra- e intermoleculares que podem monitorar o ambiente do RE, como sensores redox, e contribuir para a ativação desta via (Walter e Ron, 2011).

**IRE1:** É uma proteína transmembrana bifuncional (cinase/endoribonuclease), que utiliza um mecanismo não convencional de *splicing* de mRNA para iniciar a UPR. Sua função ribonuclease é ativada por mudanças conformacionais que ocorrem após a oligomerização e transfosforilação de IRE1 na membrana do RE. IRE1 ativada cliva um mRNA que codifica um fator de transcrição específico da UPR, o XBP1 (*X-box binding protein 1*). Este se liga ao ERSE, aumentando a atividade transcricional dos genes alvos da UPR (Schroder, 2006).

Ainda não está bem estabelecido como IRE1 é ativada pelo estresse do RE. Uma das hipóteses é que seja através da dissociação da GRP78 (Bertolotti et al., 2000), como ocorre com PERK e ATF6. Mas, há um estudo que sugere que IRE1 é ativada diretamente por proteínas mal enoveladas através da interação destas com uma espécie de sulco (tipo o complexo de histocompatibilidade – MHC) no domínio luminal, o que estimularia a formação de oligômeros e conseqüente ativação da porção citoplasmática de IRE1 (Credle et al., 2005).

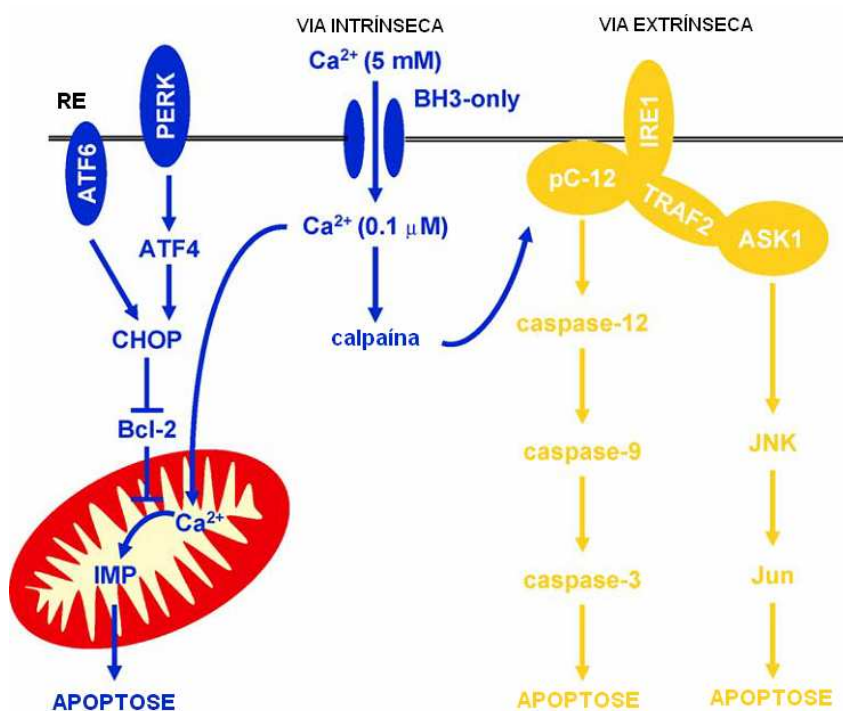
## **Apoptose associada ao Estresse do RE**

A capacidade das células responder às perturbações na função do RE é muito importante para a sobrevivência celular e caso a UPR não for capaz de restabelecer o equilíbrio celular, as células são sinalizadas para a via da apoptose. As três vias de sinalização da UPR contribuem para a indução da apoptose, sendo que este processo em resposta ao estresse do RE pode ser mediado pelo fator de transcrição CHOP, pela proteína cinase JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) e por caspases (Schroder e Kaufman, 2005; Tabas e Ron, 2011) (Figura 3), embora os mecanismos ainda não estejam bem definidos. CHOP (também conhecido com GADD153 - *growth-arrest and DNA-damage-inducible gene 153*) é um fator de transcrição altamente regulado durante o estresse do RE prolongado, sendo que a via da PERK é essencial para induzir a sua transcrição (Harding et al., 2000; Okada et al., 2002).

Vários estudos têm associado o CHOP à apoptose induzida pelo estresse do RE. Por exemplo, células CHOP<sup>-/-</sup> são parcialmente resistentes ao estresse e tem uma apoptose diminuída (Oyadomari et al., 2002; Zinszner et al., 1998). CHOP diminui a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e aumenta espécies reativas do oxigênio, o que contribui para a morte celular associada ao estresse do RE (McCullough et al., 2001). A indução de CHOP, entretanto, não é a única via envolvida na apoptose induzida pelo estresse do RE. Em resposta a este estresse, IRE1 recruta a proteína TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) para a membrana do RE, o que é regulado pela JIK (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal inhibitory kinase*) que interage tanto com IRE1 como com TRAF2 (Yoneda et al., 2001). Este complexo, então, recruta uma proteína envolvida com a apoptose, a ASK1 (*apoptosis signal regulating kinase 1*), ativando-a e conseqüentemente ativando a via da JNK, levando à morte celular (Nishitoh et al., 2002; Nishitoh et al., 1998).

As caspases (cisteína/asparagina proteases) também participam na apoptose induzida pelo estresse do RE. Em camundongos, a procaspase-12 está localizada no lado citoplasmático do RE e é clivada e especificamente ativada pelo estresse do RE, mas não por

sinais apoptóticos mediados pela mitocôndria (Nakagawa e Yuan, 2000; Nakagawa et al., 2000). Nos humanos, devido a mutações que determinam códons de parada no gene da caspase-12, tem sido proposto que a caspase-4 (homóloga à caspase-12 de camundongos) realiza a função da caspase-12 em humanos (Fischer et al., 2002). A clivagem da caspase-4 é especificamente induzida pelo estresse do RE, mas não por outros sinais apoptóticos, e o *knockdown* deste gene diminui a apoptose induzida pelo estresse do RE (Hitomi et al., 2004).



**Figura 3.** Vias apoptóticas reguladas pela UPR (adaptado de Schroder e Kaufman, 2005).



## 1.5 Estresse do Retículo Endoplasmático e THB

A UPR é um processo fundamental com funções fisiológicas importantes. O estresse do RE prolongado leva à morte celular e está associado com a fisiopatologia de algumas doenças, como as doenças neurodegenerativas (Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson), diabetes, aterosclerose, câncer, entre outras (Doyle et al., 2011; Ozcan e Tabas, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento da disfunção da UPR na fisiopatologia do THB. Experimentos farmacológicos sugerem que as chaperonas do RE, como a GRP78, GRP94 e calreticulina, sejam alvos dos estabilizadores de humor utilizados no tratamento desta doença, como o lítio (Shao et al., 2006) e o valproato (Chen et al., 2000; Kakiuchi et al., 2009). Estudos genéticos encontraram associação de um polimorfismo na região promotora de XBP1 (Kakiuchi et al., 2003) e de GRP78 (Kakiuchi et al., 2005) com o THB em uma coorte japonesa, demonstrando que alterações nestas vias podem ser um fator de risco para o desenvolvimento do transtorno.

Em outros estudos, a expressão de genes relacionados ao estresse do RE foi analisada em células linfoblastóides derivadas de pacientes bipolares. Em um dos trabalhos, a expressão de GRP78 e XBP1 estava diminuída em dois pares de gêmeos monozigóticos discordantes para o THB (Kakiuchi et al., 2003). Uma diminuição na resposta de XBP1 e CHOP também foi encontrada nas células de pacientes bipolares expostas a dois indutores do estresse do RE (So et al., 2007). Outros achados corroboraram com estes, onde verificou-se que a indução do *splicing* de XBP1 e da expressão da chaperona GRP94 estavam diminuídos (Hayashi et al., 2009). Isto sugere que as células de pacientes bipolares possuem uma disfunção no RE e não estimulam uma resposta adequada e suficiente para manter a homeostase desta organela numa situação de estresse, o que poderia levar a outras disfunções celulares e teciduais no organismo.

## 1.6 Cultura de Linfócitos para estudo do THB

Estudos bioquímicos, a partir de tecidos *post mortem* do SNC ou de amostras periféricas de pacientes são ferramentas importantes no esclarecimento da fisiopatologia do THB. A cultura de linfócitos de pacientes com doenças psiquiátricas têm sido foco de vários estudos (Naydenov et al., 2007; Tseng et al., 2008; Washizuka et al., 2005) por se tratarem de células que permitem maior facilidade de coleta, constituindo um método menos invasivo.

Acredita-se que a expressão gênica e protéica na periferia possa ser informativa quando comparada aquela no SNC e que muitos processos relevantes biologicamente não possuem diferença significativa entre sangue total e vários tecidos do SNC (Glatt et al., 2005; Sullivan et al., 2006). O estudo de Glatt e colaboradores (2005) realizou uma comparação do perfil de expressão gênica de tecidos cerebrais com aquele de células do sangue periférico, com o objetivo de identificar genes associados à esquizofrenia e que sejam comuns para os tecidos, sugerindo uma validade do perfil de expressão gênica do sangue para detecção de marcadores para a doença.

Como o THB é uma doença que acomete o organismo de forma sistêmica, muitos estudos têm utilizado material biológico periférico com o objetivo de entender melhor o mecanismo da doença. Já foi visto, por exemplo, que em linfócitos e no soro de pacientes bipolares há um aumento do estresse oxidativo e do dano ao DNA (Andreazza et al., 2007a; Andreazza et al., 2007b). Estudos com a utilização de células periféricas mostraram níveis aumentados de cálcio nas plaquetas, em linfócitos e em células linfoblásticas (Warsh et al., 2004).

Para o estudo *in vitro* do estresse do RE, é possível utilizar indutores deste tipo de estresse, como a tapsigargina e a tunicamicina. A tapsigargina inibe a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RE levando a um aumento nos níveis citosólicos de cálcio e sua redução no lúmen do RE (Treiman et al., 1998). A tunicamicina inibe a glicosilação de proteínas recém sintetizadas no RE, causando o acúmulo de proteínas mal enoveladas nesta organela (Tordai et al., 1995). A

ativação da UPR e a apoptose induzida pelo estresse do RE tem sido estudada em modelos celulares, como em cardiomiócitos (Fu et al., 2008) e linfócitos (Ma et al., 2008). No caso do THB, os estudos com a via do estresse do RE utilizaram células linfoblastóides derivadas de pacientes com a doença (Hayashi et al., 2009; So et al., 2007). Ainda são poucos, e muitas vezes divergentes, os estudos nesta área até o momento.

Assim, visando o melhor entendimento da fisiopatologia do THB, estudos com os mais variados tipos de métodos são necessários, sendo a cultura de linfócitos uma alternativa viável e de maior facilidade de manipulação para inferir sobre fenômenos que acontecem em nível de SNC e para avaliar os efeitos de fármacos.

### **1.7 Justificativa**

O THB é um transtorno psiquiátrico grave e altamente incapacitante, cuja fisiopatologia ainda não está bem estabelecida. Considerando a sua alta prevalência na população e o prejuízo que esta doença causa ao organismo, na funcionalidade e conseqüentemente na vida do paciente, bem como os gastos gerados ao sistema de saúde, estudos são necessários para o esclarecimento dos mecanismos relacionados com o THB e com sua progressão.

Até o momento, poucos estudos foram realizados para explorar o envolvimento da via do estresse do RE nas bases biológicas do THB, entretanto há evidências de que componentes da UPR estejam de alguma maneira comprometidos nos pacientes, o que sugere em conjunto com outros achados na área, que os pacientes bipolares tenham alguma vulnerabilidade celular. Considerando que as medicações de primeira linha no tratamento do THB exercem efeitos clínicos semelhantes, os estudos que visam identificar seus alvos e mecanismos moleculares são essenciais para explicar o envolvimento destas moléculas em vias de sinalização relacionadas à melhora dos sintomas. Como a disfunção na UPR pode estar associada ao mecanismo fisiopatológico do THB, a avaliação deste processo em células de

pacientes bipolares e da influência dos estabilizadores do humor pode fornecer evidências fundamentais para o estudo de tratamentos profiláticos ou de manutenção da eutimia, possibilitando um maior entendimento do papel de cada componente desta via na fisiopatologia do transtorno.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a resposta ao Estresse do Retículo Endoplasmático (*UPR*) em culturas de linfócitos de pacientes com Transtorno de Humor Bipolar e o efeito do estabilizador do humor lítio sobre este processo celular.

### 2.2 Objetivos específicos

- Induzir o estresse do RE com tunicamicina em culturas de linfócitos de pacientes bipolares e de indivíduos saudáveis (controles) seguido do tratamento das células com o estabilizador do humor lítio;
- Avaliar a UPR nestas culturas de linfócitos, através da expressão da chaperona GRP78, do fator de transcrição CHOP e de eIF2 $\alpha$  fosforilado;
- Avaliar a morte celular induzida pelo estresse do RE nas culturas de linfócitos dos pacientes bipolares e controles;
- Comparar a capacidade celular de resposta ao estresse do RE entre os pacientes bipolares de acordo com as fases da doença (mania, depressão, eutímia) e controles;
- Comparar também a UPR entre os pacientes eutímicos de acordo com o tempo de duração da doença e o número de episódios (estadiamento) e controles;
- Analisar o efeito do lítio nos parâmetros da UPR nos pacientes bipolares e controles.

## **PARTE II**

### **3. RESULTADOS**

Os resultados deste trabalho serão apresentados sob a forma de um artigo científico a ser submetido para publicação na revista *Biological Psychiatry*.

#### **3.1 Capítulo I**

*Impaired endoplasmic reticulum stress response in lymphocytes from patients with bipolar disorder*

**Title:** Impaired endoplasmic reticulum stress response in lymphocytes from patients with bipolar disorder

**Category:** Archival Reports

**Authors:** Bianca Pfaffenseller<sup>1,2,3</sup>, Bianca Wollenhaupt de Aguiar<sup>1,2</sup>, Gabriel Rodrigo Fries<sup>1,2</sup>, Gabriela Delevati Colpo<sup>1,2</sup>, Renan Kubiachi Burque<sup>1,2</sup>, Giovana Bristot<sup>1,2</sup>, Pâmela Ferrari<sup>1,2</sup>, Keila Mendes Ceresér<sup>1,2</sup>, Fábio Klamt<sup>1,3,4\*</sup>, Flávio Kapczinski<sup>1,2,5</sup>

**Authors' affiliation:**

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Translacional em Medicina (INCT), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Transtorno Bipolar e Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratório 24, ICBS / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>Rede Gaúcha de Estresse Oxidativo e Sinalização Celular (FAPERGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Medicina Legal e Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**\*Corresponding Author:**

Prof Fábio Klamt, PhD

Departamento de Bioquímica, Laboratório 24 - ICBS / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Porto Alegre - RS - Brazil

CEP 90035-003

E-mail: 00025267@ufrgs.br

**Word count of the abstract: 250**

**Word count of the article body: 4970**

**Number of figures: 3**

**Number of tables: 2**

**Supplemental information: zero**

## Abstract

**Background:** Bipolar disorder (BD) is a severe chronic psychiatric disorder that has been associated with several cellular dysfunctions, mainly related to mitochondria, neurotrophin levels and oxidative stress. But the role of an impaired endoplasmic reticulum (ER) stress response in BD is not well established. Here we aimed to evaluate the unfolded protein response (UPR) and the outcome of this cellular process in lymphocytes from BD patients and healthy subjects. **Methods:** Lymphocytes from 30 BD patients and 32 age- and sex-matched controls were treated with tunicamycin, an ER stressor, for 12 or 24 h in order to measure levels of UPR-related proteins (GRP78, eIF2 $\alpha$ -P and CHOP) by flow cytometry, and for 48 h to analyze ER stress-induced cell death. **Results:** In the control group, inductions of GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P by tunicamycin after 12 and 24 h and of CHOP after 24 h were observed. Tunicamycin-induced increases in UPR-related proteins were not found in the BD group. Among euthymic patients, those at an early stage of disorder had a better response to ER stress when compared to patients in advanced stages. Tunicamycin-induced cell death was significantly higher in BD patients compared to controls. No differences in the evaluated proteins and death levels in tunicamycin-treated lymphocytes were observed when clinical doses of lithium were post-administrated. **Conclusions:** This study extends earlier findings about impaired ER stress response in primary cultures of lymphocytes from BD patients. ER dysfunction may be associated with decreased cellular resilience in BD, ultimately contributing to the progression of the disorder.

**Key words:** Bipolar disorder, endoplasmic reticulum stress, GRP78, CHOP, eIF2 $\alpha$ -P, staging.

## **Introduction**

Bipolar disorder (BD) is a chronic and severe illness characterized by recurrent episodes of mania and depression, which affects around 2.4% of the population worldwide (1) and is associated with high clinical morbidity (2). The long-term prognosis for BD is of concern, given that even its subsyndromic symptoms are frequently associated with persistent cognitive and functional impairment due to the progression of the disorder (3). There are significant differences between patients in early and late stages of illness, such as anatomical differences in brain structures, cognitive function (4; 5), plasma levels of inflammatory and neurotrophic markers (6), mitochondrial dysfunction and oxidative stress parameters (7).

Studies have shown that dysfunction in several intracellular signaling pathways may affect neuroplasticity and cellular resilience in BD, including mechanisms involving neurotransmitters, glucocorticoids, neurotrophic and anti-apoptotic factors, cell survival pathways, calcium signaling, among others (8; 9). For instance, increased levels of calcium were found in platelets, lymphocytes and lymphoblastoid cells from BD patients (10; 11), and an increased susceptibility to cell death in cells of olfactory neuroepithelium was also reported (12). Considering that peripheral markers related to oxidative stress, inflammation and neurotrophins are altered in BD patients (13), studies with peripheral samples may be potential tools to assess possible pathways involving cellular plasticity in BD. Whereas cellular resilience is the ability of cells to adapt to an insult or stress, impaired resilience at the cellular level observed in BD may be associated with an increased vulnerability of patients under stressful environmental conditions and therefore with a worse outcome.

The mechanisms underlying these cellular dysfunctions found in BD patients have not yet been elucidated, whether they are due to a specific cellular defect or to changes in functions of organelles involved in the maintenance of cellular resilience, such as mitochondria and endoplasmic reticulum (ER). Evidences have associated ER with BD,

including pharmacological experiments that suggest that levels of ER chaperones, such as GRP78/BiP, GRP94 and calreticulin, are modulated by mood stabilizers used in the treatment of this disorder, such as lithium (14) and valproate (15; 16). Moreover, mefloquine, an antimalarial drug known to cause ER dysfunction, induces mania in vulnerable individuals (17).

In addition to its role in calcium storage and signaling and in lipids synthesis, ER is responsible for the synthesis, folding, and post-translational modifications of secretory and cell surface proteins that are destined to the cell or the extracellular medium (18). When perturbations in the ER lumen occur, such as alteration in redox state, in calcium homeostasis or defects in post-translational modifications, the function of this organelle is compromised and unfolded proteins accumulate. This condition is known as ER stress (19; 20). The cellular response to this, the Unfolded Protein Response (UPR), is an adaptive response in which cells activate protective mechanisms to restore homeostasis in the lumen of the ER (19; 21). This response occurs through different ways: induction of ER chaperones which promote folding of unfolded proteins, inhibition of protein synthesis, induction of protein degradation pathway, and induction of apoptosis in case the ER stress is severe and chronic and UPR is not sufficient to restore the balance. In mammals, the first response to ER stress is transient global translation attenuation, mediated by the PERK signaling. PERK is an ER transmembrane protein associated with the GRP78 under normal conditions. When unfolded proteins accumulate during ER stress, GRP78 dissociates from PERK, allowing PERK to autophosphorylate and dimerize (22; 23). Activated PERK phosphorylates eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 $\alpha$ ), inhibiting global protein synthesis (22). However, some mRNAs are preferentially translated when eIF2 is limited. One of these mRNAs encodes the transcription factor ATF4, which regulates CHOP (transcription factor C / EBP homologous protein) (20), a transcription factor involved in ER stress-related apoptosis.

The UPR is a fundamental process with important physiological functions. Prolonged ER stress leads to cell death, and some previous studies have suggested the involvement of the UPR dysfunction in the pathophysiology of BD. For instance, genetic studies found an association of a polymorphism in the promoter region of XBP1, a transcription factor that induces the expression of ER chaperones (24), and in GRP78 (25) with BD in a Japanese cohort, suggesting that alterations in these pathways can be a risk factor for developing this disorder. In other studies, the expression of genes related to ER stress was evaluated in lymphoblastoid cells derived from BD patients. GRP78 and XBP1 were reduced in two pairs of monozygotic twins discordant for BD (24). In addition, a decreased response of XBP1 and CHOP was also found in lymphoblastoid cells from BD patients exposed to two ER stress inducers (26). Others findings have confirmed these results, which found that induction of XBP1 *splicing* and GRP94 expression were reduced (27).

Taken together, these findings suggest that BD patients may present a dysfunctional UPR which may impair the homeostasis in the ER under stressful situations. To extend these results and analyze if this possible ER dysfunction in BD is related to an impaired cellular resilience and illness progression, this study evaluated the UPR in cultured lymphocytes from patients with BD and the outcome of this cellular process. More specifically, we evaluated GRP78, phosphorylated eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P), CHOP expression and ER stress-induced cell death and sought to determine whether changes in these parameters differ according to the time of illness and number of episodes. Furthermore, we evaluated the effect of lithium on these factors in patients and healthy subjects.

## **Methods and Materials**

### **Subjects**

The study included 30 BD patients (20 euthymic, 6 depressive and 4 hypomaniac) and 32 age- and sex-matched healthy controls (Table 1). Patients were recruited at the Bipolar Disorders Program (PROTAHBI), an outpatient program of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Control group was recruited at the Blood Bank from the same hospital and included healthy individuals without previous history of psychiatric illness as well as no history of psychiatric or neurologic disorders in first-degree relatives.

BD patients were diagnosed according to the DSM-IV Axis I (SCID-I) criteria. Depressive and manic symptoms were evaluated using the Hamilton Depression Rating Scale - HDRS (28) and Young Mania Rating Scale (YMRS) (29), respectively. Exclusion criteria for both patients and controls included history of autoimmune diseases or chronic infection/inflammatory disorders, as well as any severe systemic disease or use of immunosuppressive therapy. This protocol was approved by the ethics committee of HCPA (project 10-091) and all subjects provided their written informed consent before inclusion in the study.

### **Sample collection, cell isolation and cell culture**

Ten to 20 mL of peripheral blood from patients and controls were obtained by venipuncture and collected in heparin tubes. Two to four hours after blood sampling, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) density gradient centrifugation, according to manufacture's instructions. The resulting PBMC suspension contains mostly lymphocytes (30). Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco<sup>®</sup>), gentamicin (100 ug/mL) and amphotericin B (0.25 ug/mL). Cells were cultured at a concentration of 500,000

cells/mL in different culture plates, according to the experiment. The cells were maintained at 37°C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, for up to 72 h. All culture conditions were selected based on preliminary tests.

### **Drug treatment**

For the pharmacological induction of ER stress, lymphocytes were incubated with 2.4 µM tunicamycin for 12, 24 or 48 h. Tunicamycin was chosen because it prevents the glycosylation of newly synthesized proteins in the ER, causing the accumulation of unfolded proteins (31). To determine optimal tunicamycin concentration on the induction of UPR proteins, cells isolated from healthy subjects ( $n = 3$ ) were incubated with three doses of tunicamycin (1.2, 2.4 or 13.5 µM) for three different incubation times (4, 12 and 24 h), after which ER stress parameters were analyzed.

To evaluate the effects of lithium on UPR, cells were incubated with 0.5 mM or 1.5 mM lithium carbonate after 12 h of incubation with tunicamycin, followed by 12 or 36 h of co-incubation, according to the experiment. Lithium concentrations were selected based on its therapeutic plasma levels (32).

Viability tests were performed with lithium and tunicamycin-treated cells to define their concentrations and time of treatment.

### **Intracellular staining**

For intracellular detection of GRP78, eIF2α-P and CHOP levels, lymphocytes were seeded in 12-well culture plates at a density of 500,000 cells/well overnight and treated with tunicamycin (2.5 µM) for 12 h. Afterwards,  $2 \times 10^6$  cells were collected for immunostaining, and remaining cells were cotreated with lithium (0.5 mM or 1.5 mM) or treated with lithium alone in both concentrations for further 12 h. Control cells were remained untreated.

After treatment, cells were washed twice with PBS and blocked with 10% goat serum and 10% human serum in PBS for 20 min at 4°C. Then, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) for 20 min at 4°C. Thereafter, cells were washed with BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences), incubated with 10% goat serum in PBS for 20 min at 4°C followed by incubation with primary antibodies in a total volume of 50 µL in BD Perm/Wash at 4°C for 2 h (250,000 cells were used for each staining). Primary antibodies used were rabbit anti-human GRP78 (1:100), rabbit anti-human eIF2 $\alpha$ -P (1:100) and rabbit anti-human CHOP (1:200) (all from Sigma Aldrich). Subsequently, cells were washed and stained with fluorescent secondary antibody Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen) 1:400 in a total volume of 50 µL in BD Perm/Wash for 30 min at 4°C protected from light. Afterwards, stained cells were washed and analyzed by flow cytometry.

### **Flow cytometric acquisition**

Instrument set-up and calibration was performed prior to data acquisition according to standard procedures using Calibrite beads and AutoComp setting. Data acquisition and analysis were performed using a FACScalibur (BD Biosciences) flow cytometer. Flow cytometry data were analyzed using BD *CellQuest* Pro software (BD Biosciences). Lymphocytes were identified by FSC/SSC pattern and 10,000 events per gate were collected from each staining. Baseline autofluorescence control and isotype-matched negative controls for fluorescence antibodies were used as reference to set the fluorescence thresholds for positivity. The median fluorescence intensity (MFI) of positive cells was analyzed and data were expressed as fold increase of control (MFI of untreated cells for each staining).

### **Cellular Viability**

Cell viability was evaluated by the quantification of [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) reduction to a blue formazan product by cellular



dehydrogenases, as previously described (33) with minor modifications. Lymphocytes were seeded in 96-well plates at a density of 100,000 cells/well. After overnight incubation, cells were treated with or without tunicamycin (2.4  $\mu$ M) for 12 h and subsequently cotreated with lithium (0.5 mM or 1.5 mM) or treated with lithium alone in both concentrations for more 36 h. Untreated cells were used as control. Each treatment condition was tested in 4 replicate wells. After the treatment, 20  $\mu$ L of MTT (5 mg/mL in PBS; Sigma<sup>®</sup>) were added to each well and further incubated for 4 h at 37°C. Then, medium was discarded and DMSO was added to solubilize the formazan crystals. The absorbance was determined at 560 and 630 nm in a SoftMax Pro Microplate Reader (Molecular Devices<sup>®</sup>, USA). Data were expressed as % of control (untreated cells).

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using Statistical Product and Service Solutions (SPSS) Version 18.0. The normality of data distribution was assessed with the Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk, 1965). Wilcoxon test and Friedman's ANOVA (followed by Wilcoxon test with Bonferroni correction, when significant) were used to compare non-parametric variables between related samples. Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test were used to compare non-parametric variables between independent samples. To compare parametric variables we performed repeated measures ANOVA (with Bonferroni correction, when significant) for related samples and independent *t* test. Differences in gender among comparison groups were evaluated with the Chi-square test or Fisher's exact test. Differences in medication between euthymic patients were evaluated with the Fisher's exact test.

Quantitative variables were expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median and interquartile range according to data distribution. In all experiments, *P* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance, except when the Bonferroni correction was used (*P* values less than 0.01 were considered).

## Results

### Clinical parameters and Drug Treatments

Table 1 shows relevant clinical characteristics of the BD patients and healthy subjects (controls) selected for this study. Further BD patient stratification in early and late disorder stages was performed based on clinical parameters such as duration of disease and number of episodes (according to Kapczinski et al., 2009), and are shown in Table 2. This patient stratification was performed to evaluate potential differences in the capacity of patients from early and late states to activate the UPR cascade in response to ER stress. There was no statistical difference in age and gender among groups and no statistical differences in medications between euthymic patients.

Dose response curve of tunicamycin (1.2, 2.4 and 13.5  $\mu\text{M}$ ) were performed in lymphocytes isolated from healthy subjects to establish the best conditions to evaluate the UPR cascade in response to ER stress (time of treatment, cellular toxicity, GRP78, eIF2 $\alpha$ -P and CHOP protein levels). Based on these results, we found that 2.4  $\mu\text{M}$  of tunicamycin for 12 and 24 h was able to induce early (increase in GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P protein levels) and late (CHOP expression) UPR response in treated cells without significant decrease in cellular viability (data not shown). Cell viability was also determined after 48 h of treatment to establish the capacity of cells to resolve ER stress. Lithium concentrations were selected based on its therapeutic plasma levels (Sproule, 2002).

### UPR protein levels and ER stress-induced cell death

Treatment of lymphocytes isolated from control group with tunicamycin for 12 and 24 h significantly increased GRP78 ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.001$ , respectively) and eIF2 $\alpha$ -P levels ( $P < 0.0001$  for both incubation times, Figure 1A). CHOP protein levels were found increased just after 24 h of tunicamycin treatment ( $P = 0.004$ ). These processes (early and sustained

increase in GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P proteins and late induction of CHOP) reflect a physiological and orchestrated UPR response by control cells to ER stress. In contrast, no such differences in UPR parameters were found in lymphocytes isolated from BD patients (Figure 1A). Treatment with tunicamycin for 48 h induced cell death in a significant way in both controls and BD patients ( $P < 0.0001$  for both groups; Figure 1B). However, the cell death levels found in tunicamycin-treated lymphocytes isolated from BD patients was almost two fold higher when compared to control group (50.4% and 28.67%, respectively;  $P < 0.0001$ ).

Once demonstrated the differences in UPR response to ER stress between cells isolated from control and BD patients, we decided to investigate the role of disorder progression in these imbalance (Figure 2). When we compared the UPR parameters between euthymic patients according to BD staging, we found differences in GRP78 ( $P = 0.001$ ) and eIF2 $\alpha$ -P expression ( $P = 0.047$ ) between controls and patients at late stage, whereas no differences were found between controls and patients at early stage in cells treated with tunicamycin for 12 h (Figure 2A). After 24 h of treatment with tunicamycin, this difference was observed between control group and both patients at early and late stage, for GRP78 ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.003$ , respectively) and eIF2 $\alpha$ -P levels ( $P = 0.004$ ,  $P = 0.001$ , respectively; Figure 2A). Cell death levels in response to tunicamycin between euthymic patients at early and late stages were also evaluated, and difference was found between controls and patients in both early and late stages ( $P = 0.01$  and  $P < 0.0001$ , respectively; Figure 2B).

We then evaluated the effect of lithium in tunicamycin-induced ER stress and UPR response. Co-treatment with lithium (0.5 mM and 1.5 mM) did not significantly change the levels of UPR proteins when compared to cells treated with only tunicamycin. Basal GRP78 protein levels were increased in lymphocytes treated with lithium 1.5 mM alone when compared to untreated cells ( $P = 0.002$ ). Moreover, lithium treatment did not reverse tunicamycin-induced cell death. Nevertheless, co-treatment with lithium after the first 12 hours of treatment with tunicamycin significantly decreased cell death in the control group at

both 0.5 mM and 1.5 mM ( $P = 0.024$ ,  $P = 0.004$  respectively), and in BD group at 1.5 mM ( $P = 0.026$ ).

When we analyzed cellular death in lymphocytes treated with tunicamycin considering the mood state, we found differences between controls and depressive patients ( $P = 0.027$ ) and controls and euthymic patients ( $P < 0.0001$ ), and no differences between mood states. Taking the mood states into account, we observed that GRP78 levels significantly differed between depressed patients and controls after 12 hours of treatment with tunicamycin ( $P = 0.23$ ) and between euthymic patients and controls after 12 and 24 h of treatment ( $P = 0.004$  and  $P < 0.0001$ , respectively) (data not shown). For eIF2 $\alpha$ -P, there were differences between controls and depressed patients ( $P = 0.009$ ) and controls and euthymics ( $P < 0.0001$ ) after treatment with tunicamycin for 24 h. No differences were observed between mood states (data not shown).

## Discussion

In this study, we evaluated several cellular markers of the unfolded protein response (UPR) in lymphocytes from BD patients and controls under pharmacological induction of ER stress. In the control group, we observed an early increase in GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P protein levels after treatment with tunicamycin, and this increase was maintained after 24 h of treatment. We also found a late induction of the transcription factor CHOP in this group. Our results showed that, as expected, there was a coordinated modulation of UPR elements in response to ER stress in healthy individuals. However, no induction of UPR-related proteins was found in BD group, except when we compared the UPR parameters between euthymic patients according to BD staging. In this case, we found that patients at early stage, but not those in advanced stages, showed GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P levels similar to controls in treatment of 12 h with tunicamycin. In addition, we also evaluated the cell death as an outcome of the induction of ER stress. We have also found a higher cell death in BD patients compared to controls, which might reflect an impaired resolution to ER stress in this group. This parameter had never been previously evaluated in cells from BD patients in response to ER stress, and accounts for the basal susceptibility of the cell to this specific type of stress. No relevant biological effect of clinical doses of lithium was observed in any parameter evaluated. Moreover, this is the first study ever to evaluate UPR parameters in primary cultures of BD patients and the response to ER stress according to the progression of disorder. These results will be discussed further below.

The novel findings reported here support that healthy individuals activate classical UPR cascade (at least the evaluated PERK pathway) in response to tunicamycin, as demonstrated by the increased levels of eIF2 $\alpha$ -P, and latter increase in CHOP protein (20). No induction of UPR-related proteins in BD group found in this study indicates a possible dysfunction in PERK activation in patients, since GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P levels were found

unchanged. In addition, the lack of induction of CHOP may reflect changes in components of the signaling pathway that controls its transcription, which is predominantly regulated through the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 cascade (35; 36). This impaired response to ER stress might also be related to several impairments in neural function described for BD patients, given that UPR components are also involved in neural development and plasticity, maturation and transport of several receptors and in calcium signaling (37-39).

Lymphocytes from patients showed a very pronounced cell death in response to tunicamycin treatment, suggesting that the UPR dysfunction may reflect an increased susceptibility to ER stress. The lack of GRP78 induction might be related to this, given that this protein plays major roles associated with cell survival, including protein folding, calcium binding, anti-apoptotic responses and regulation of the UPR signaling (40; 41). Given that treatment with tunicamycin induced a decrease in cell viability, it would be interesting to evaluate if this process is related to the activation of programmed cell death (or apoptosis) and whether ER stress-induced apoptosis can be inhibited pharmacologically, in order to analyze the possibility to use it as a therapeutic target. We found increased CHOP levels in the control group after 24 h of treatment with tunicamycin. Prolonged activation of CHOP can cause apoptosis in both physiological and pathophysiological conditions (42). In the first case, as probably occurred in the cells from healthy subjects, the apoptosis induced by the UPR itself may be a mechanism to eliminate cells that remain with impaired RE activities despite activation of components of the stress response. In BD patients, we did not observe any induction of CHOP, although their lymphocytes were more susceptible to tunicamycin-induced cell death than controls. In mutant cells for eIF2 $\alpha$  and *PERK*<sup>-/-</sup> cells, even though CHOP expression does not increase in response to ER stress, these cells still activate apoptotic pathways (43; 44). Moreover, defects in CHOP gene delay but do not prevent ER stress-induced apoptosis in pancreatic cells from mice deficient in insulin gene (45). Therefore, induction of CHOP does not seem to be the only pathway involved in ER stress-

associated apoptosis. Cells can activate apoptosis by other pathways mediated by protein kinase JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) through IRE1 activation and caspases (42; 46), more specifically caspase-12. ER-localized procaspase-12 is converted to caspase-12 by calpain when calcium is released from ER lumen during ER stress and initiates a caspase cascade through cleavage of procaspase-9 and -3 by caspase-9. Ca<sup>2+</sup> released from the ER is rapidly taken up by mitochondria where it may lead to collapse of the inner membrane potential and initiation of apoptosis (47). Considering that PERK is essential to induce CHOP transcription (35; 48) and that this pathway appears to be impaired in BD patients, it is possible that the marked cell death observed in this group, in case of involving apoptosis, might have been induced by other mechanisms rather than directly by CHOP. Of note, high apoptosis in BD has been previously demonstrated (49; 50), both in postmortem tissue (51) and in peripheral blood samples (52). As described here for the first time, chronic ER stress-induced cell death may be an important factor in BD progression.

In addition to identifying UPR parameters in BD patients, we analyzed the differences in the response to ER stress according to the mood state and stage of disorder. Although the number of patients in the acute phases was rather small in this study, our observations suggest that the ER stress response does not seem to depend on the mood state, given that the differences between patients and controls were found also in euthymia. When the expression of UPR components was compared between controls and euthymic patients according to the stage of disorder, we found differences that suggest that patients in early stages have a response to stress through induction of GRP78 and eIF2 $\alpha$ -P under moderate ER stress (which would correspond to treatment with tunicamycin for 12 h). However, after a longer period of ER stress (treatment with tunicamycin for 24 h), no UPR modulation was found in patients, regardless of the staging. These observations show that the ER response seems to depend on stress chronicity and that there is a differential cellular response according on the number of episodes and duration of disorder. Although the number of patients used in these comparisons

was relatively small, one might speculate that the dysfunction in ER stress response observed in BD patients is not closely associated with mood states, but with the progression of the disorder. As seen in this study, the response pattern of patients at early stages is between that of patients at late stages and controls. Furthermore, although the cell death was increased in patients compared to controls regardless of staging, this difference was more significant when controls were compared to patients at late stages. Thus, it is possible that patients at early stages can still respond to moderate ER stress, which does not occur at any time with the patients in advanced stages. In fact, patients at early stages have a much better clinical outcome than those with multiple episodes (53; 54), and there are differences in biochemical parameters according to stages of disorder (6; 7).

These data suggest that protective cellular mechanisms may become less effective after multiple episodes and longer duration of disorder, which can lead to more apparent damage caused by biological changes. This is in accordance with the staging model for BD (34; 55) and confirms the theory of the involvement of "allostatic load" in this illness (3; 56), which refers to the various and cumulative physiological factors needed for adaptation to stress. This concept contributes to the theory that early intervention may improve response to treatment and prognosis for BD patients (57). ER stress may be a novel promising target to be included in the list of pathways associated with BD neuroprogression (58; 59).

We also evaluated the effects of the mood stabilizer lithium on UPR parameters. Evidences suggest that mood stabilizers such as lithium and valproate regulate proteins of the ER stress pathway (14; 15; 60). However, in this study, co-treatment with lithium in a concentration similar to its therapeutic plasma levels (0.5 mM) and in a higher concentration (1.5 mM) after treatment with tunicamycin for 12 h did not significantly change GRP78, eIF2 $\alpha$ -P and CHOP levels when compared to untreated cells. Kakiuchi et al (2003) also found no induction of GRP78 in lymphoblastoid cells derived from BD patients after treatment with mood stabilizers (lithium, valproate and carbamazepine), but observed increased ATF6 levels



after treatment with valproate (24). This may be due to the different drug concentrations employed, which could have an effect only on upstream components of the signaling pathway. Regarding the cell outcome of the experiment, even though co-treatment with lithium did not reverse tunicamycin-induced cell death, it led to a small yet statistically significant decrease in this parameter. Since the effect of lithium on lymphocytes was modest in this study more studies are needed to clarify whether this drug exerts some kind of modulation in UPR parameters.

Our findings differ from those of So et al. (2007) (26) and Hayashi et al. (2009) (27), which found no differences in GRP78 expression in lymphoblastoid cells between BD patients and controls after treatment with tunicamycin and thapsigargin, and are similar to the results of Kakiuchi et al. (2003), which also showed a reduced induction of this chaperone in the ER stress response in patients (24). As seen in our study, So et al. (2007) also reported a decreased CHOP expression in response to ER stress in BD patients (26). In general, our results corroborate with other studies that evaluated ER stress in lymphoblastoid cells from BD patients and found an impaired response. The differences between studies are likely due to differences in patient population and cell culture conditions. Regarding the cell culture, we evaluated the UPR in primary culture of lymphocytes from BD patients in contrast to other studies using lymphoblastoid cells derived from patients, which are obtained after *in vitro* transformation of lymphocytes with Epstein-Barr virus and acquire cell line characteristics. Although lymphoblastoid cells are widely used in research of neurological diseases (61), there is some concern about the possibility of relevant genetic changes occurring during generation and maintenance of this cell type. Even techniques designed to maintain lymphoblastoid cells, such as freezing, may impair protein folding resulting in ER stress (27). Thus, our study with primary lymphocyte cultures from BD patients and healthy subjects complements other studies performed in lymphoblastoid cells for a better understanding of the involvement of ER stress in BD.

Despite our interesting results on the response to ER stress, this study lacks data on basal ER stress level in lymphocytes from controls and BD patients, which could not be analyzed due to technical issues (data were normalized according to untreated cells of each individual, thus being presented as relative values to baseline values). Therefore, it was not possible to assess whether the decreased response in BD patients' cells under ER stress is due to a dysfunction in UPR pathway or whether baseline ER stress was already increased in patients, not allowing us to observe additional induction of these proteins with *in vitro* treatment. In this sense, even though basal levels of GRP78 and XBP1 transcripts were reduced in two pairs of monozygotic twins discordant for BD, there were no significant differences in these parameters between BD patients and controls (24). The study of So et al. (2007) (26) also observed similar basal levels of XBP1, GRP78 and CHOP mRNA in BD patients and healthy subjects, and the same was found for the levels of XBP1, GRP94, GRP78, calreticulin, and CHOP mRNAs in the study from Hayashi et al. (2009) (27). These findings suggest that basal levels of UPR components do not differ between patients and controls and could not have affected the analysis of our results. Further studies should further elucidate whether the ER dysfunction in BD patients is constitutive even in basal conditions or if it occurs only in situations in which cells are under stress.

Our results, along with other data on ER stress in BD, reinforce the involvement of the UPR pathway in the pathophysiology of this disorder. Our findings suggest that cells from BD patients have a dysfunction in the ER stress response, most likely in PERK pathway components, and do not stimulate an appropriate and sufficient response to maintain the homeostasis of this organelle under stress situations. This could be associated with a greater vulnerability to stress events and consequently with other cellular and tissue impairments. In summary, ER dysfunction may be associated with decreased cellular resilience under stress conditions in BD patients, ultimately contributing to the progression of the disorder.

## **Acknowledgements**

This study was supported by the Brazilians funds MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7), FINEP/IBN-Net (01060842-00), PRONEX/FAPERGS (1000274), FAPERGS (1009613/PqG 2010-6) and FIPE-HCPA (100191) (Brazil).

## **Financial disclosures**

Prof. Kapczinski has received grant/research support from Astra-Zeneca, Eli Lilly, the Janssen-Cilag, Servier, CNPq, CAPES, NARSAD and the Stanley Medical Research Institute; has been a member of the speakers' boards for Astra-Zeneca, Eli Lilly, Janssen and Servier; and has served as a consultant for Servier.

Prof Klamt has received a fellowship from MCT/CNPq.

Dr Ceresér has received grants from CNPq, FAPERGS and CAPES.

Bianca Pfaffenseller, Gabriela Delevati Colpo, Renan Kubiachi Burque, Pâmela Ferrari and Giovana Bristot are supported by scholarships from CNPq, Brazil.

Gabriel R. Fries and Bianca W. de Aguiar are supported by scholarships from CAPES, Brazil.

## References

1. Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, et al (2011): Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry* 68:241-251.
2. Kupfer DJ (2005): The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA* 293:2528-2530.
3. Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, et al (2008): Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 32:675-692.
4. Lyoo IK, Sung YH, Dager SR, Friedman SD, Lee JY, Kim SJ, et al (2006): Regional cerebral cortical thinning in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 8:65-74.
5. Strakowski SM, DelBello MP, Zimmerman ME, Getz GE, Mills NP, Ret J, et al (2002): Ventricular and periventricular structural volumes in first- versus multiple-episode bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 159:1841-1847.
6. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, et al (2009): Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:447-458.
7. Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Goncalves CA, et al (2009): 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34:263-271.

8. Gould TD, Manji HK (2002): Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res* 53:687-697.
9. Hunsberger JG, Austin DR, Chen G, Manji HK (2009): Cellular mechanisms underlying affective resiliency: the role of glucocorticoid receptor- and mitochondrially-mediated plasticity. *Brain Res* 1293:76-84.
10. Dubovsky SL, Murphy J, Thomas M, Rademacher J (1992): Abnormal intracellular calcium ion concentration in platelets and lymphocytes of bipolar patients. *Am J Psychiatry* 149:118-120.
11. Perova T, Wasserman MJ, Li PP, Warsh JJ (2008): Hyperactive intracellular calcium dynamics in B lymphoblasts from patients with bipolar I disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:185-196.
12. McCurdy RD, Feron F, Perry C, Chant DC, McLean D, Matigian N, et al (2006): Cell cycle alterations in biopsied olfactory neuroepithelium in schizophrenia and bipolar I disorder using cell culture and gene expression analyses. *Schizophr Res* 82:163-173.
13. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al (2011): Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 45:156-161.
14. Shao L, Sun X, Xu L, Young LT, Wang JF (2006): Mood stabilizing drug lithium increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in primary cultured rat cerebral cortical cells. *Life Sci* 78:1317-1323.

15. Chen B, Wang JF, Young LT (2000): Chronic valproate treatment increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Biol Psychiatry* 48:658-664.
16. Kakiuchi C, Ishigaki S, Oslowski CM, Fonseca SG, Kato T, Urano F (2009): Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One* 4:e4134.
17. Dow GS, Caridha D, Goldberg M, Wolf L, Koenig ML, Yourick DL, et al (2005): Transcriptional profiling of mefloquine-induced disruption of calcium homeostasis in neurons in vitro. *Genomics* 86:539-550.
18. Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004): A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14:20-28.
19. Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007): Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22:193-201.
20. Walter P, Ron D (2011): The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334:1081-1086.
21. Kimata Y, Kohno K (2011): Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 23:135-142.

22. Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397:271-274.
23. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2:326-332.
24. Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, Bundo M, Kasahara T, Kusumi I, et al (2003): Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet* 35:171-175.
25. Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, et al (2005): Functional polymorphisms of HSPA5: possible association with bipolar disorder. *Biochem Biophys Res Commun* 336:1136-1143.
26. So J, Warsh JJ, Li PP (2007): Impaired endoplasmic reticulum stress response in B-lymphoblasts from patients with bipolar-I disorder. *Biol Psychiatry* 62:141-147.
27. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Toyota T, Yoshikawa T, Kato T (2009): Aberrant endoplasmic reticulum stress response in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:33-43.
28. Hamilton M (1960): A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23:56-62.
29. Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA (1978): A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry* 133:429-435.

30. Boyum A (1976): Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* 5:9-15.
31. Tordai A, Brass LF, Gelfand EW (1995): Tunicamycin inhibits the expression of functional thrombin receptors on human T-lymphoblastoid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 206:857-862.
32. Sproule B (2002): Lithium in bipolar disorder: can drug concentrations predict therapeutic effect? *Clin Pharmacokinet* 41:639-660.
33. Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
34. Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Grassi-Oliveira R, Colom F, et al (2009): Clinical implications of a staging model for bipolar disorders. *Expert Rev Neurother* 9:957-966.
35. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K (2002): Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366:585-594.
36. Oyadomari S, Mori M (2004): Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11:381-389.



37. Vandenberghe W, Nicoll RA, Bredt DS (2005): Interaction with the unfolded protein response reveals a role for stargazin in biosynthetic AMPA receptor transport. *J Neurosci* 25:1095-1102.
38. Verkhratsky A (2002): The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. *Cell Calcium* 32:393-404.
39. Weng WC, Lee WT, Hsu WM, Chang BE, Lee H (2011): Role of glucose-regulated Protein 78 in embryonic development and neurological disorders. *J Formos Med Assoc* 110:428-437.
40. Ni M, Zhang Y, Lee AS (2011): Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* 434:181-188.
41. Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, et al (2002): Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 514:122-128.
42. Tabas I, Ron D (2011): Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13:184-190.
43. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al (2001): Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7:1165-1176.

44. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al (2003): An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11:619-633.
45. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, et al (2002): Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109:525-532.
46. Schroder M, Kaufman RJ (2005): ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569:29-63.
47. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002): An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287-34294.
48. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al (2000): Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099-1108.
49. Schloesser RJ, Huang J, Klein PS, Manji HK (2008): Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 33:110-133.
50. Uranova N, Orlovskaya D, Vikhreva O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V, et al (2001): Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 55:597-610.

51. Kim HW, Rapoport SI, Rao JS (2010): Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Neurobiol Dis* 37:596-603.
  
52. Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, et al (2007): DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 153:27-32.
  
53. Tohen M, Waternaux CM, Tsuang MT (1990): Outcome in Mania. A 4-year prospective follow-up of 75 patients utilizing survival analysis. *Arch Gen Psychiatry* 47:1106-1111.
  
54. Schuepbach D, Novick D, Haro JM, Reed C, Boeker H, Noda S, et al (2008): Determinants of voluntary vs. involuntary admission in bipolar disorder and the impact of adherence. *Pharmacopsychiatry* 41:29-36.
  
55. Vieta E, Reinares M, Rosa AR (2011): Staging bipolar disorder. *Neurotox Res* 19:279-285.
  
56. Grande I, Magalhaes PV, Kunz M, Vieta E, Kapczinski F (2012): Mediators of allostasis and systemic toxicity in bipolar disorder. *Physiol Behav* 106:46-50.
  
57. Berk M, Malhi GS, Hallam K, Gama CS, Dodd S, Andreazza AC, et al (2009): Early intervention in bipolar disorders: clinical, biochemical and neuroimaging imperatives. *J Affect Disord* 114:1-13.
  
58. Berk M (2009): Neuroprogression: pathways to progressive brain changes in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:441-445.

59. Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, et al (2011): Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 35:804-817.
60. Bown CD, Wang JF, Chen B, Young LT (2002): Regulation of ER stress proteins by valproate: therapeutic implications. *Bipolar Disord* 4:145-151.
61. Sie L, Loong S, Tan EK (2009): Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res* 87:1953-1959.

## Figure Legends

**Figure 1. ER stress response in lymphocytes from BD patients and controls. (A)** Protein levels of GRP78, eIF2 $\alpha$ -P and CHOP. Lymphocytes from BD patients and healthy subjects were treated with 2.4  $\mu$ M tunicamycin for 12 or 24 hours. Intracellular detection of GRP78 (upper), eIF2 $\alpha$ -P (middle) and CHOP (lower) were determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. The median fluorescence intensity (MFI) of positive cells was analyzed and data were calculated as fold increase of control (MFI of untreated cells for each staining). Data are expressed as the median and interquartile range for a minimum of 15 subjects in each treatment. **(B)** ER stress-induced cell death. Lymphocytes from BD patients and healthy subjects were treated with 2.4  $\mu$ M tunicamycin for 48 hours. Cell viability was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Data were calculated as % of control (untreated cells) and are expressed as the media  $\pm$  SD for a minimum of 20 subjects in each treatment. \*  $P < 0.05$  or 0.01; \*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*  $P < 0.0001$ .

**Figure 2. ER stress response in lymphocytes from euthymic patients according to stages of disorder. (A)** Protein levels of GRP78, eIF2 $\alpha$ -P and CHOP. Data represent cells treated with 2.4  $\mu$ M tunicamycin for 12 or 24h and were calculated as fold increase of untreated cells. Data are expressed as the median and interquartile range for a minimum of seven subjects in each treatment. **(B)** ER stress-induced cell death. Data represent cells treated with 2.4  $\mu$ M tunicamycin for 12 or 24 h and were calculated as % of untreated cells. Data are expressed as the median and interquartile range for a minimum of eight subjects in each treatment. \*  $P < 0.05$  or 0.01; \*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*  $P < 0.0001$ .

**Figure 3. Effect of lithium on ER stress response in lymphocytes from BD patients and controls. (A)** Protein levels of GRP78, eIF2 $\alpha$ -P and CHOP. The lymphocytes from BD

patients and healthy subjects were treated with 2.4  $\mu$ M tunicamycin for 12 h and then cotreated with lithium (0.5 mM or 1.5 mM) or treated with lithium alone in both concentrations for further 12 h. Control cells remained untreated. Intracellular detection of GRP78 (upper), eIF2 $\alpha$ -P (middle) and CHOP (lower) were determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. The median fluorescence intensity (MFI) of positive cells was analyzed and data were calculated as fold increase of control (MFI of untreated cells for each staining). Data are expressed as the median and interquartile range for a minimum of 15 subjects in each treatment. \*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*  $P < 0.0001$ . **(B)** ER stress-induced cell death. The lymphocytes from BD patients and healthy subjects were treated with 2.4  $\mu$ M tunicamycin for 12 h and subsequently cotreated with lithium (0.5 mM or 1.5 mM) or treated with lithium alone in both concentrations for more 36 h. Untreated cells were used as control. Cell viability was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Data were calculated as % of control (untreated cells) and are expressed as the mean  $\pm$  SD for a minimum of 18 subjects in each treatment. Statistical differences are expressed by different letters ( $P < 0.0001$ , except between b/d ( $P < 0.001$ ) and between b/c and e/f ( $P < 0.01$ )).

**Table 1. Characteristics of the BD and control groups**

	<b>Controls</b> <b>n = 32</b>	<b>BD patients</b> <b>n = 30</b>	<b>p value</b>
<b>Age</b>	42.94 ± 12.17	46.47 ± 11.96	.255a
<b>Female sex</b>	20	19	1.00b
<b>Mood state</b>			
Euthymia	n/a	20	-
Depression	n/a	6	-
Hypomania	n/a	4	-
<b>Proportion on</b>			
Lithium	0	43.3%	-
Other mood stabilizers	0	56.7%	-
Antipsychotics	0	76.7%	-
Antidepressants	0	20%	-

<sup>a</sup> = Independent-Samples *t* test. Data show as mean ± standard deviation

<sup>b</sup> = Chi-square test. Data is present % (n) for medications.

**Table 2. Clinical features of 20 euthymic patients in the early and late stages of BD**

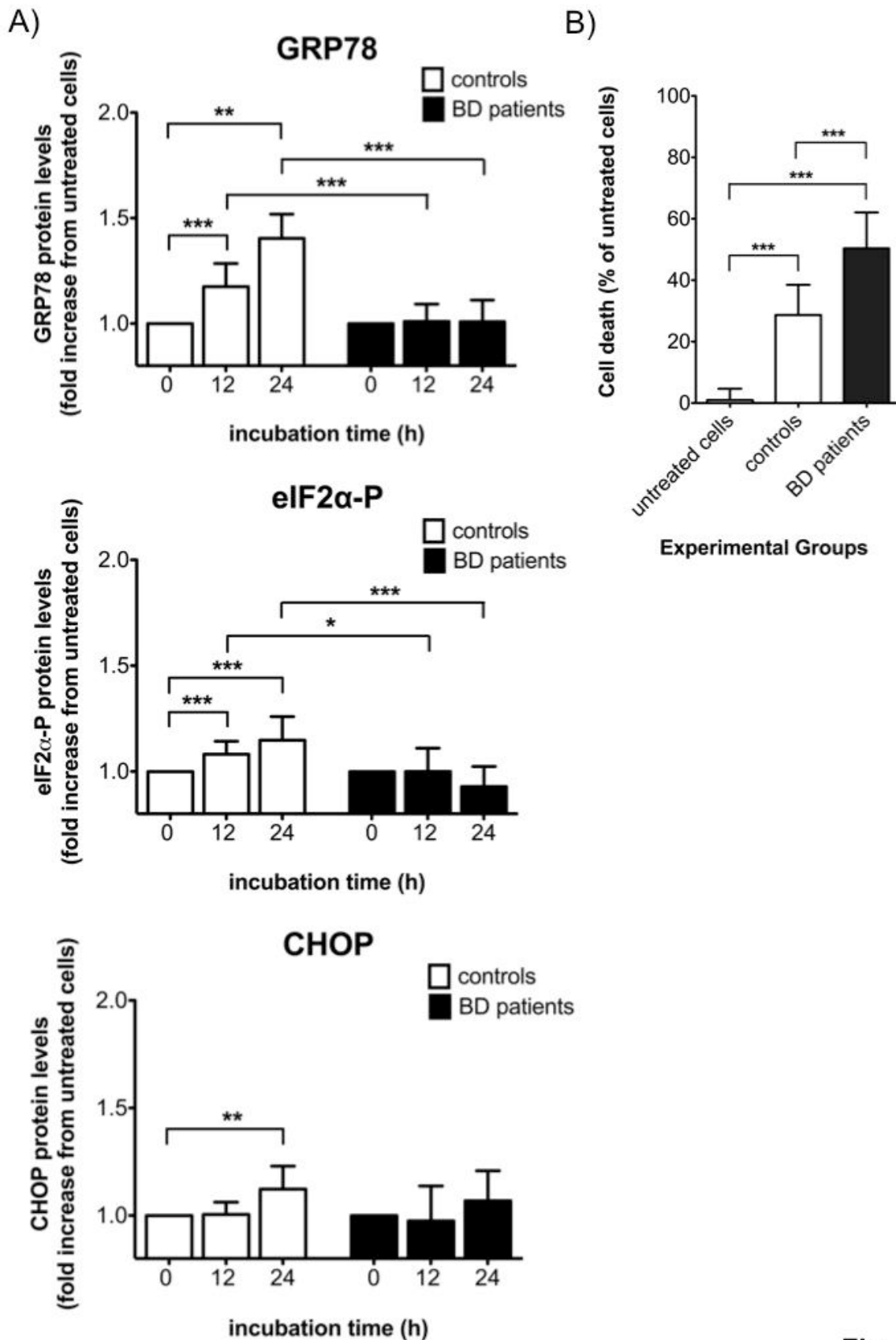
<b>Euthymic patients</b>	<b>Early (n= 10)</b>	<b>Late (n= 10)</b>	<b><i>p</i> value</b>
<b>Age</b>	43.4 ± 9.3	52.6 ± 14.1	.103 <sup>a</sup>
<b>Female sex</b>	80%	40%	.170 <sup>b</sup>
<b>Duration of illness</b>	7.5 (4.5; 13.75)	23.5 (14.25; 32)	.023 <sup>c</sup>
<b>Number of episodes</b>	2 (1; 3)	11 (5.75; 22.75)	<.0001 <sup>c</sup>
<b>Proportion on</b>			
Lithium	60%	30%	.370 <sup>b</sup>
Other mood stabilizers	50%	70%	.650 <sup>b</sup>
Antipsychotics	60%	90%	.303 <sup>b</sup>
Antidepressants	30%	10%	.582 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> = Student *t* test. Data show as mean ± standard deviation.

<sup>b</sup> = Fisher's exact test. Data is presented % (n) for medication and sex variables.

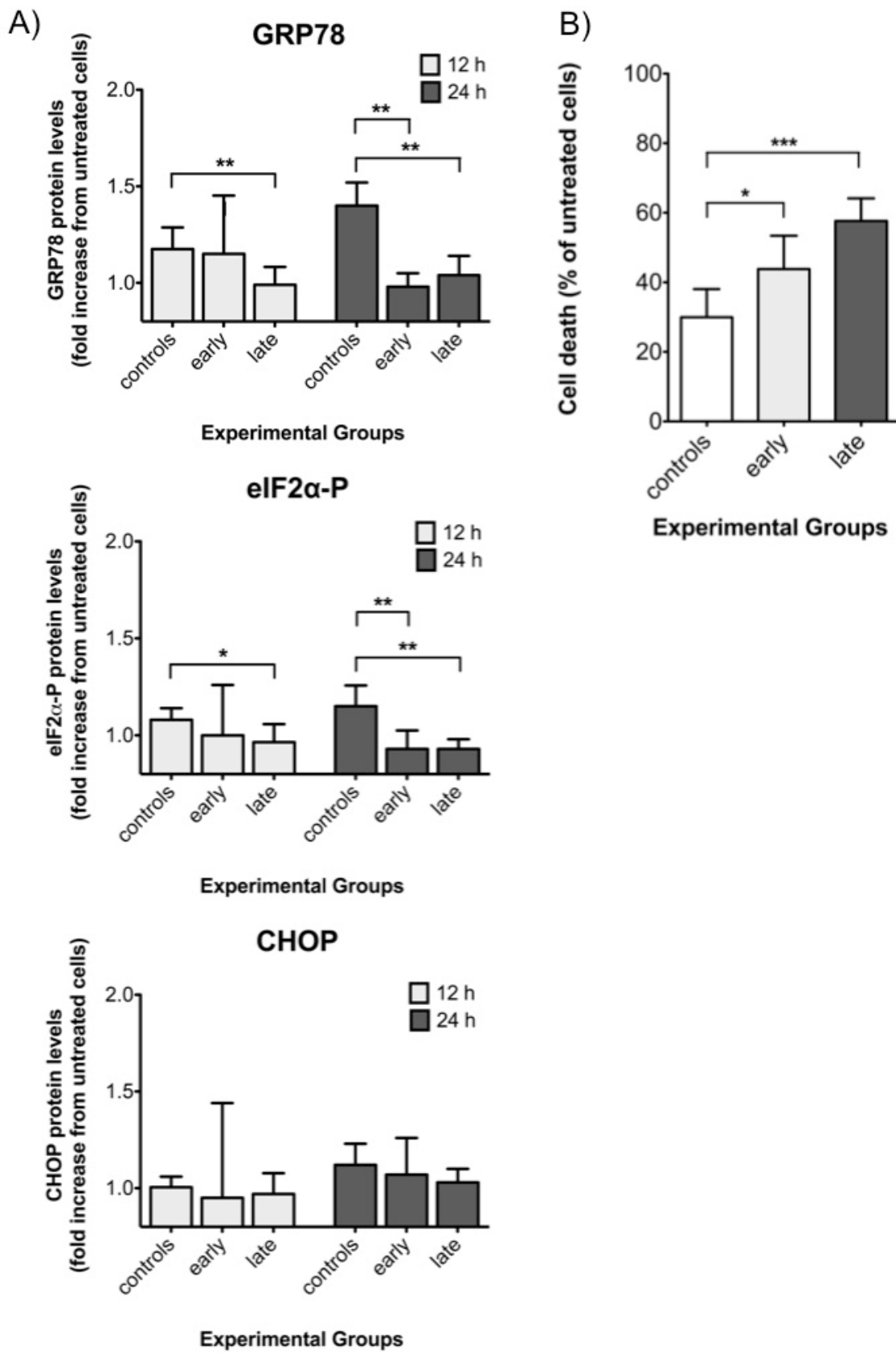
<sup>c</sup> = Mann-Whitney test. Data show as median and interquartile range (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles)  
Comparison between euthymic patients at early (n=10) and late stage (n=10) and controls (n=32)  
were not significant for gender (p=.200) and age (p=.090).





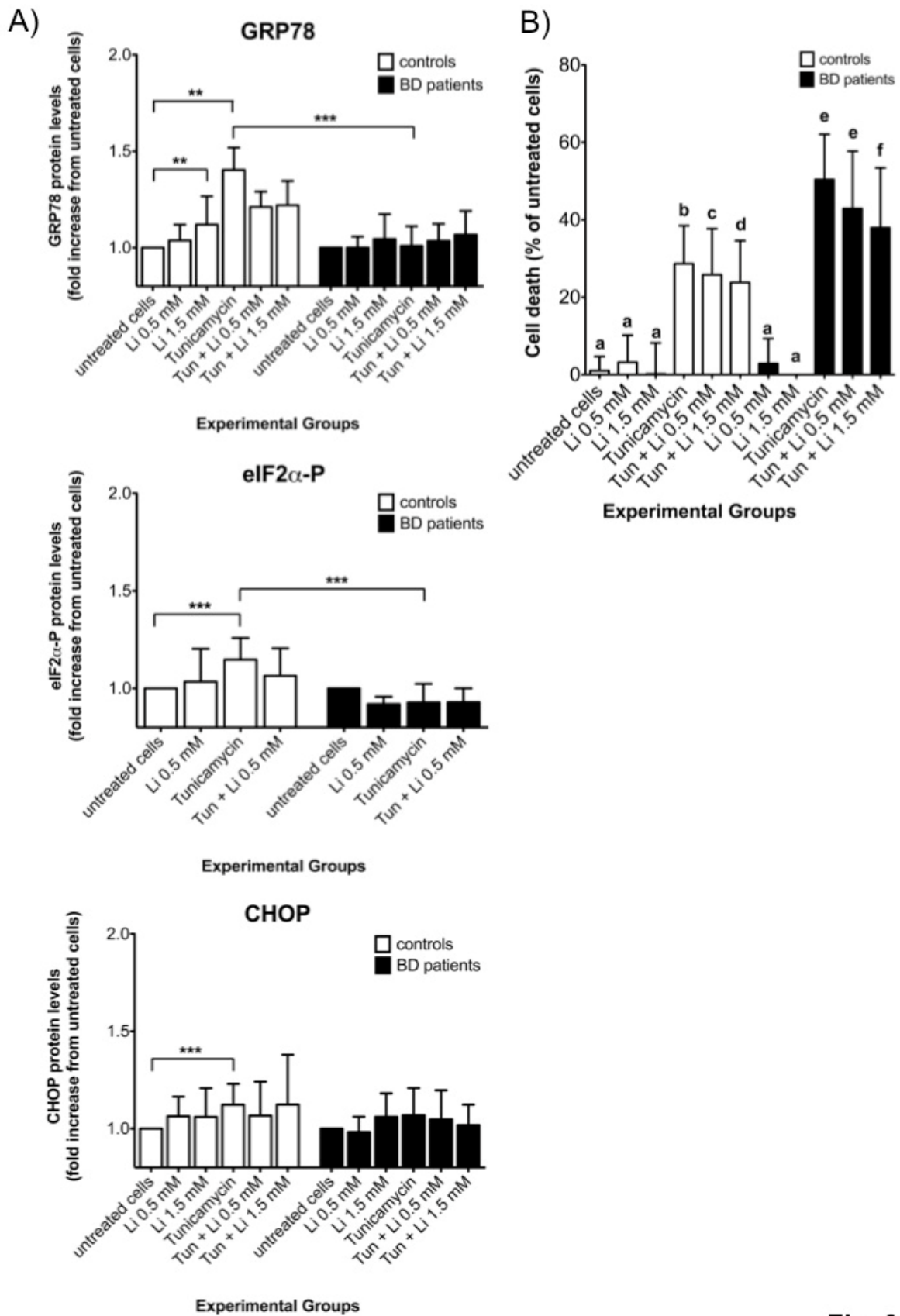
**Fig. 1**

Figure 1. ER stress response in lymphocytes from BD patients and controls.



**Fig. 2**

**Figure 2. ER stress response in lymphocytes from euthymic patients according to stages of disorder.**



**Fig. 3**

**Figure 3. Effect of lithium on ER stress response in lymphocytes from BD patients and controls.**

# **PARTE III**

#### 4. DISCUSSÃO

A associação do THB com disfunções em várias vias de sinalização intracelular sugere que os pacientes bipolares apresentam uma resiliência celular comprometida (Kato, 2008; Shaltiel et al., 2007). Entre os possíveis mecanismos que possam contribuir para este processo estão aqueles relacionados com o RE, já que há evidências do envolvimento desta organela na fisiopatologia e no tratamento do THB (Chami et al., 2004; Dow et al., 2005; Wang e Young, 2004). Nesta dissertação, avaliamos a resposta ao estresse do RE induzido farmacologicamente com tunicamicina em culturas de linfócitos de pacientes com THB e de indivíduos saudáveis e a morte celular associada a este processo. Além disso, analisamos a relação desta resposta com o estadiamento da doença e o efeito do estabilizador do humor lítio nestes parâmetros.

Diferentemente dos indivíduos saudáveis, que apresentaram uma capacidade de modulação dos parâmetros da UPR (*Unfolded Protein Response*), observamos um prejuízo na resposta dos pacientes bipolares, tanto após o tratamento de 12 h com tunicamicina quanto no tratamento de 24 h, havendo diferenças na resposta entre os pacientes eutímicos de acordo com o estadiamento da doença após 12 h de tratamento com o indutor. A resposta diminuída ao estresse do RE observada nos pacientes refletiu em uma maior morte celular neste grupo, quando comparado aos controles. O estabilizador de humor lítio não alterou significativamente os níveis das proteínas da UPR após a indução do estresse do RE e não reverteu a morte celular induzida por tunicamicina, entretanto o fármaco contribuiu um pouco neste último parâmetro, em ambos os grupos.

Nossos dados sugerem que os pacientes bipolares não ativaram a via da PERK, pois o principal substrato desta proteína, eIF2 $\alpha$ , não teve seus níveis de fosforilação aumentados após tratamento com tunicamicina, como ocorreu no grupo controle. Além disso, não houve indução de CHOP nos pacientes e este fator é regulado principalmente pela via da

PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 (Okada et al., 2002; Oyadomari e Mori, 2004). Mas, possivelmente a disfunção na resposta ao estresse do RE no THB não se deve somente à via da PERK, visto que a expressão protéica de GRP78 também não foi modulada nos pacientes e esta é uma chaperona altamente regulada em resposta ao estresse do RE, sendo que sua expressão é induzida por mais de uma via, principalmente pela via da ATF6 (Baumeister et al., 2005) (vide Figura 1 da Introdução). Além disso, outros trabalhos já verificaram alterações em outros parâmetros da UPR em pacientes com THB, como alterações em XBP1 (Kakiuchi et al., 2003; So et al., 2007), pertencente à via IRE1. A via de IRE1 tem sido a mais documentada no THB através destes estudos com XBP1. Quanto à via de ATF6, verificou-se que os níveis desta proteína não estavam alterados entre pacientes bipolares e controles em resposta a indutores do estresse do RE (Kakiuchi et al., 2003). Considerando estas informações, avaliamos no presente trabalho basicamente a via da PERK, ainda não tão explorada no THB, com o objetivo de identificar componentes importantes envolvidos com a possível diminuição da resposta ao estresse do RE nos pacientes bipolares.

O grupo controle apresentou uma modulação temporal dos componentes da PERK, primeiro com aumento de eIF2 $\alpha$ -P em 12h, o qual foi mantido por 24 h de tratamento com o indutor, seguido da indução de CHOP durante o período maior de tratamento. Isso está de acordo com a cascata de sinalização da PERK, que quando ativada, fosforila a subunidade  $\alpha$  de eIF2, inibindo a síntese proteica global (Harding et al., 1999) e ativando a tradução de mRNAs específicos, com o fator de transcrição ATF4, que regula CHOP (*transcription factor C/EBP homologous protein*) e GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*) (Walter e Ron, 2011). Os níveis de CHOP aumentam quando o estresse do RE persiste (Zinszner et al., 1998), o que foi mimetizado no nosso trabalho pelo tratamento de 24 h com tunicamicina. CHOP regula a apoptose através de vários mecanismos, como a inibição do fator anti-apoptótico Bcl-2, alteração do estado redox celular pela depleção de glutatona, promove a atividade de caspases (McCullough et al., 2001) e a translocação de Bax do citosol

para a mitocôndria (Gotoh et al., 2004). Possivelmente, nos controles, a morte celular induzida por tunicamicina representa a apoptose associada ao estresse do RE, modulada por CHOP. Já, nos pacientes, como não houve aumento de CHOP e a morte celular foi bem pronunciada, talvez essa morte seja reflexo da apoptose ativada por outras vias, como a via da JNK ou via caspase-12 (Morishima et al., 2002) ou ainda decorrente de outros processos, como necrose ou autofagia. Assim, outros estudos são necessários para avaliar as vias envolvidas na morte celular induzida pelo estresse do RE em indivíduos saudáveis e em pacientes bipolares. Seria interessante, por exemplo, avaliar neste modelo experimental, os níveis de Bcl-2 e Bax, de caspases e parâmetros redox, além de realizar experimentos com inibidores de caspases e ensaios de apoptose. Processos de necrose e autofagia após estresse do RE também poderão ser investigados em estudos posteriores para ampliarmos o entendimento a respeito da resposta ao estresse do RE no THB.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com achados anteriores (Kakiuchi et al., 2009; So et al., 2007) sobre a possível disfunção da resposta ao estresse do RE no THB. Mas, este é o primeiro trabalho com cultura primária de pacientes bipolares, já que os demais foram realizados em linhagens de células linfoblastóides, que são linfócitos dos pacientes transformadas com o vírus Epstein-Barr (EBV). Ainda não se sabe exatamente o que este processo de transformação viral pode causar nas células, respostas celulares a tratamentos poderiam diferir entre linfócitos e células transformadas pelo EBV, provavelmente devido às mudanças induzidas pelo vírus nas células transformadas. Por exemplo, já se observou que células transformadas pré-imortais apresentavam mutação em p53 e diminuição da expressão de p16/Rb e que células pós-imortais cuja população já duplicou várias vezes desde o seu isolamento apresentavam alterações celulares como instabilidade cromossomal, mudança na resposta à apoptose e na sensibilidade a agentes citotóxicos (Sugimoto et al., 2004). O cultivo primário, embora seja de curta duração e haja limitação na quantidade de amostra, possui a vantagem de que as células são cultivadas diretamente a partir da coleta da amostra do

paciente, permitindo uma melhor representação da variabilidade em um grupo de indivíduos e assim, a geração de dados fisiologicamente relevantes (Cenni et al., 1999; Stacey e MacDonald, 2001). É interessante notar que mesmo com a alta variabilidade encontrada entre os indivíduos, o que geralmente caracteriza estudos realizados com cultura primária, diferenças significativas na modulação da resposta ao estresse do RE foram observadas entre os dois grupos analisados neste trabalho.

As duas metodologias (linhagem celular X cultura primária) se complementam no estudo das possíveis vias envolvidas no THB. A cultura de linfócitos de pacientes com doenças psiquiátricas é uma ferramenta importante, pois é um método menos invasivo e permite inferir sobre processos celulares relacionados com a fisiopatologia destes transtornos, como o THB, visto que esta é uma doença que afeta o organismo de forma sistêmica (Kapczinski et al., 2011) e alterações já foram observadas em células periféricas destes pacientes, incluindo mudanças nos níveis de cálcio (Warsh et al., 2004) e em parâmetros de estresse oxidativo e dano ao DNA (Andreazza et al., 2007a; Andreazza et al., 2007b). Entretanto, quando se fala em cultivo celular, é relevante observar também a possibilidade de que os parâmetros analisados sejam influenciados pelas condições do meio celular. Por exemplo, o período que as células ficam em cultura, entre a coleta da amostra e a análise, poderia fazer com que alterações bioquímicas que possivelmente ocorram *in vivo* não sejam mais observadas. Assim, uma limitação do nosso trabalho é a falta de dados em linfócitos frescos (não cultivados), o que poderia fornecer dados sobre os níveis basais dos parâmetros avaliados, embora alguns estudos não tenham encontrado diferenças na expressão gênica basal de componentes da UPR entre pacientes bipolares e controles (Hayashi et al., 2009; Kakiuchi et al., 2003; So et al., 2007). Enquanto outros estudos com THB avaliaram a UPR através da expressão gênica, nosso trabalho se focou na avaliação da resposta ao estresse do RE através da dosagem de níveis proteicos.



Nosso estudo induziu o estresse do RE *in vitro* através do tratamento das células com tunicamicina, um inibidor da glicosilação no RE. Todas as proteínas recém sintetizadas que entram na via secretória passam por várias modificações pós-traducionais, entre elas, destaca-se o processo de N-glicosilação protéica, que inicia no RE (Roth et al., 2010). A glicosilação de proteínas é importante para as funções biológicas destas, pois confere estabilidade e proteção contra proteases, mas seu papel mais geral está relacionado ao controle de qualidade do enovelamento proteico (Helenius e Aebi, 2004; Roth et al., 2010). No RE, os glicanos promovem o enovelamento diretamente através da estabilização dos polipeptídeos e indiretamente pois permitem que as glicoproteínas interajam com várias lecitinas (calnexina e calreticulina), glicosidases e glicosiltransferases, componentes envolvidos no controle de qualidade do processamento proteico, que somente permite a secreção de proteínas corretamente modificadas e enoveladas. Se alguma etapa não for realizada corretamente, as proteínas são retidas no lúmen do RE ou marcadas para a degradação (Roth et al., 2010). A tunicamicina é um análogo de açúcar produzido por várias espécies de *Streptomyces* e inibe a enzima que catalisa a primeira etapa da glicosilação protéica, levando ao acúmulo de proteínas no lúmen do RE e posterior ativação da resposta ao estresse do RE (Price e Tsvetanova, 2007).

Assim, se a inibição do processo de glicosilação ou de outra modificação pós-traducional, ou alguma alteração nessas vias, também for observada *in vivo* nos pacientes, isso poderia levar ao estresse do RE, como foi reproduzido *in vitro* no nosso trabalho. Ainda são poucos os estudos que sugerem a relação destas vias no THB. Análises genéticas observaram alteração em um gene que codifica uma enzima da via de N-glicosilação, a qual co-segrega em uma família pequena com THB (Baysal et al., 2002). Entre os vários genes relacionados com o transtorno, alguns estão envolvidos no transporte e processamento protéico (Carter, 2007), como o gene ALG9 (*asparagine-linked glycosylation 9 homolog*), envolvido com a N-glicosilação (Frank et al., 2004). Defeitos neste gene estão associados com aumento do

estresse do RE (Freeze, 2002; Shang et al., 2002). Além da inibição da glicosilação, mimetizada no presente estudo, outros fatores podem causar estresse do RE, como depleção de cálcio do lúmen da organela, estresse oxidativo, privação de nutrientes, entre outros (Rutkowski e Kaufman, 2004). A questão mais relevante é que se os pacientes bipolares, diante deste estresse, não conseguem ativar adequadamente as vias de resposta, possivelmente a disfunção no RE, a longo prazo, pode estar relacionada a outros processos observados em pacientes bipolares, como o aumento de apoptose (Schloesser et al., 2008; Uranova et al., 2001) e a diminuição da resiliência celular (Kato, 2008; Shaltiel et al., 2007).

A apoptose induzida pelo estresse do RE crônico tem sido relacionada à fisiopatologia de várias doenças, como diabetes, doenças neurodegenerativas, aterosclerose e doença renal (Kaufman, 2002), podendo ser também um fator importante no THB. Considerando que o estresse do RE pode estar envolvido com outras doenças (Ozcan e Tabas, 2012) e que o THB está associado com várias comorbidades (Kupfer, 2005), os critérios de inclusão e exclusão deste trabalho foram bastante restritos, de modo que os pacientes recrutados não apresentavam doença ou condição médica que pudesse interferir na UPR e consequentemente na análise dos resultados. Os mesmos critérios também foram aplicados para o recrutamento do grupo controle. Entretanto, é importante observar que esta disfunção no RE encontrada nos pacientes, junto com outros fatores de risco, pode predispor os pacientes a outras doenças, como diabetes, bastante prevalente entre os bipolares (McIntyre et al., 2005).

Quanto à resiliência celular, verificamos que os linfócitos dos pacientes bipolares foram mais suscetíveis ao estresse do RE e a morte celular induzida por tunicamicina foi maior neste grupo do que nos controles. Embora nosso estudo tenha observado uma disfunção no RE em células da periferia, esse mesmo processo pode estar acontecendo no Sistema Nervoso Central (SNC), contribuindo para a progressão da doença. Se uma resposta diminuída ao estresse do RE ocorrer de forma sistêmica pelo organismo do pacientes, isto poderia estar relacionado com outros tipos de prejuízos, como aqueles que afetam a cognição

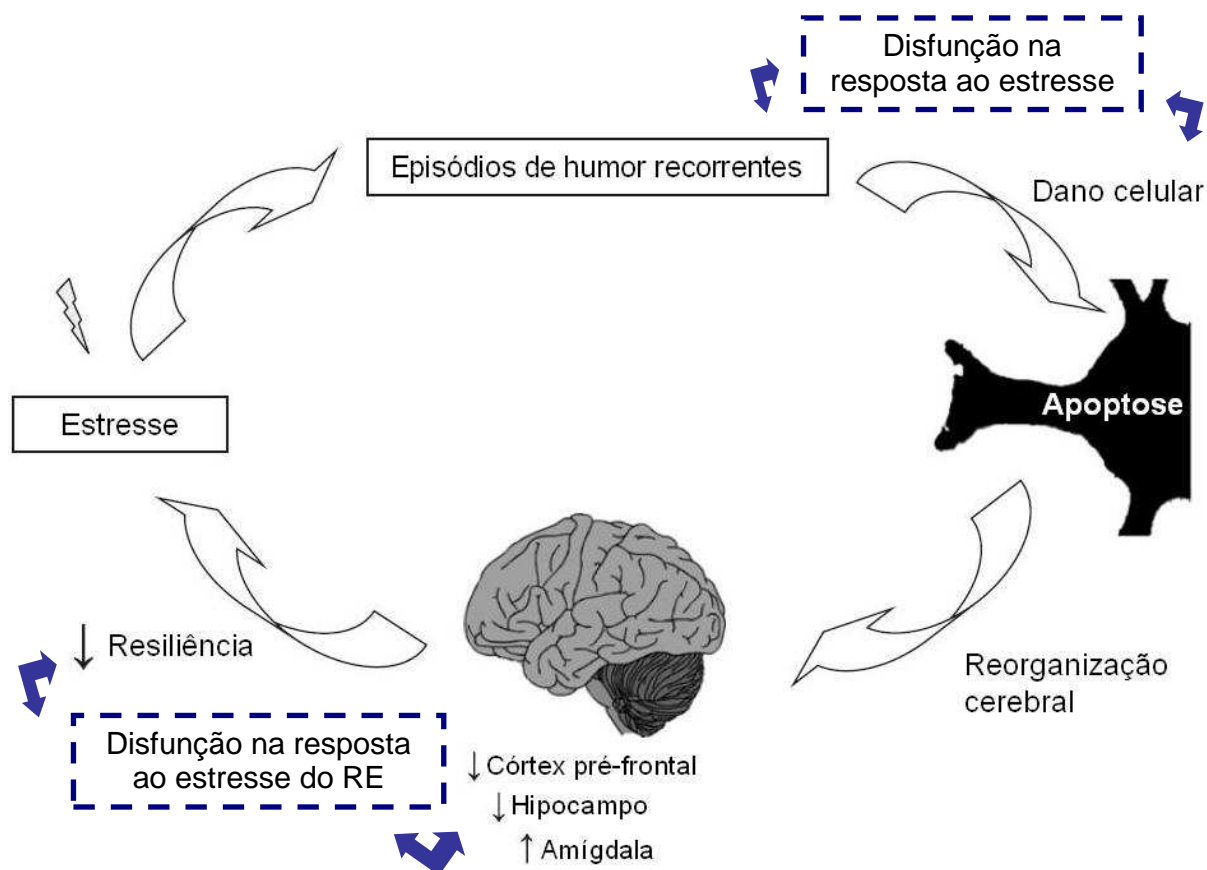
e funcionalidade da maioria dos pacientes bipolares, até mesmo em períodos de remissão dos sintomas de humor, o que contribui para a morbidade associada com o transtorno (Zarate et al., 2000). Esses prejuízos relacionados a comorbidades psiquiátricas e médicas e déficits cognitivos são vistos particularmente em pacientes em estágios mais avançados da doença, depois de terem passado por múltiplos episódios de humor (Torres et al., 2007). Achados do nosso grupo mostraram que parâmetros bioquímicos também podem alterar significativamente entre estágios iniciais e avançados do THB (Andreazza et al., 2009; Kauer-Sant'Anna et al., 2009). Por exemplo, os níveis de TNF-alfa e IL-6 estavam aumentados em ambos os estágios comparados a controles, enquanto os níveis de BDNF estavam diminuídos no estágio avançado e não no inicial (Kauer-Sant'Anna et al., 2009).

Nesse contexto, se encaixa a teoria da carga alostática no THB, que busca compreender como o estresse cumulativo associado a doenças psiquiátricas se reflete na progressão da doença (Kapczinski et al., 2008) (Figura 4). Alostase é a capacidade de atingir a estabilidade através de mudanças (McEwen, 2000), o que permite ao organismo responder a várias situações através de alterações fisiológicas. Entretanto, se estes processos se tornam extremos ou ineficientes, a capacidade de resposta do organismo diminui e processos vão se acumulando de modo que mais sistemas regulatórios são comprometidos (carga alostática) (McEwen, 2000), com prejuízo na neuroplasticidade e induzindo a progressão da doença (o que tem sido conceituado como “neuroprogressão” do THB) (Berk, 2009). Entre os mediadores da alostase, destacam-se os glicocorticóides. Quando em excesso de forma crônica, iniciam várias disfunções no organismo, o que pode envolver disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, inflamação e diminuição de fatores neurotróficos, processos observados em pacientes bipolares (Grande et al., 2012). Entretanto, ainda não há estudos relacionando a via dos glicocorticóides com a via do estresse do RE no THB. Como os estudos têm indicado que o estresse do RE pode contribuir para a resiliência celular diminuída no transtorno, seria

válido investigar se o estresse crônico, representado pelos altos níveis de cortisol observados em pacientes bipolares (Cervantes et al., 2001), tem efeito sobre os parâmetros da UPR.

Baseando-se em achados com THB que verificaram diferenças em parâmetros bioquímicos de acordo com o estadiamento da doença, resolvemos comparar os níveis das proteínas relacionadas com a UPR e desfecho de morte celular entre pacientes eutímicos em diferentes estágios da doença, para avaliar se resposta diminuída ao estresse do RE depende da progressão da doença. Observamos que os linfócitos dos pacientes eutímicos em estágio inicial respondem melhor que aqueles em estágio final diante do estresse do RE, pois houve indução de GRP78 e eIF2 $\alpha$ -P após 12 h de tratamento com tunicamicina, o que não ocorreu entre os pacientes em estágio mais avançado. Além disso, a diferença na morte celular foi maior entre controles e pacientes avançados do que entre controles e pacientes em estágio inicial.

As consequências observadas em função do número de episódios de humor sugerem uma aparente toxicidade associada aos episódios agudos. Por exemplo, a hipercortisolemia induzida pelo estresse durante um episódio de humor pode resultar em toxicidade de células neuronais, diminuição nos receptores de glicocorticóides e eventual morte celular e tecidual (Altshuler et al., 2004). O aumento de toxicidade associada a uma diminuição de mecanismos protetores pode ser responsável pelas mudanças neuroanatômicas associadas à progressão do THB e estar relacionada às alterações bioquímicas que se diferenciam de acordo com o número de episódios e tempo de doença e que são observados mesmo nos pacientes estabilizados (Figura 4). Em relação a parâmetros de resposta ao estresse do RE, este trabalho é o primeiro que observa estas diferenças entre os pacientes eutímicos conforme o estadiamento do transtorno. Porém, estes resultados devem ser analisados com cautela, considerando que o número de pacientes utilizados para estas análises de acordo com o estadiamento foi reduzido. Outros estudos são necessários para fortalecer esta hipótese.



**Figura 4. Remodelamento cerebral após vários episódios de humor e estresse recorrente.**

Estressores têm um impacto sobre o substrato neural, o que pode estar associado com doenças psiquiátricas. No caso do THB, a reatividade do substrato neural é alterada através da ocorrência de múltiplos episódios, que causam dano celular e levam a reorganização cerebral, com modificações em estruturas cerebrais. Este processo está relacionado a questões emocionais e resiliência diminuída, o que deixa os pacientes bipolares mais vulneráveis ao estresse cotidiano (adaptado de Kapczinski et al, 2008). Como a resposta prejudicada ao estresse do RE observada no THB possivelmente está associada a uma menor resiliência celular, esta via pode contribuir para as alterações encontradas em pacientes bipolares em decorrência da progressão da doença.

A relevância de estabelecer parâmetros bioquímicos que se diferenciam de acordo com o estadiamento da doença é compreender melhor como ocorre a progressão do THB, identificar quais vias estão mais envolvidas em cada estágio, para desenvolver tratamento específicos para cada um deles e realizar intervenções terapêuticas precocemente, de modo a evitar a neuroprogressão. Nesse sentido, são importantes os estudos que avaliam o efeito de fármacos nos processos celulares possivelmente relacionados com o THB. Nesta dissertação,

avaliamos o efeito do lítio, estabilizador do humor frequentemente utilizado no tratamento do THB, sobre os parâmetros da UPR. Embora outros estudos tenham sugerido o envolvimento da indução de GRP78 e outras chaperonas nos efeitos protetores do lítio e do valproato contra a morte celular induzida pelo estresse do RE (Hiroi et al., 2005), nosso estudo observou efeitos modestos do lítio. No grupo controle (linfócitos provenientes de indivíduos saudáveis), houve um aumento de GRP78 no tratamento somente com lítio 1,5 mM, não havendo modulação das proteínas no co-tratamento com lítio após indução do estresse do RE com tunicamicina. O lítio não foi capaz de reverter a morte induzida pela tunicamicina, embora tenha diminuído um pouco este parâmetro.

A GRP78 forma um complexo com a caspase-7 e com a caspase-12, prevenindo a liberação da caspase-12 do RE e assim, inibindo a ativação de caspase pelo estresse do RE (Rao et al., 2002). Isto sugere que a falta de indução de GRP78 no grupo de pacientes bipolares pode estar relacionada com a morte celular aumentada comparada ao grupo controle. Entretanto, como o lítio não apresentou efeito significativo nos níveis das proteínas da UPR, isto pode estar relacionado com a sua inabilidade em reverter a morte celular induzida pela tunicamicina, em ambos os grupos. Outros estudos com lítio são importantes para esclarecer o efeito deste fármaco na UPR. Condições diferentes de cultivo celular, como tempos maiores de incubação com o lítio, e outros estabilizadores do humor, como o valproato, poderiam ser avaliados. Uma observação relevante é que todos os pacientes analisados neste trabalho estavam tomando medicações psiquiátricas, o que também poderia interferir na análise dos dados. Entretanto, não houve correlação da medicação com nenhuma das variáveis avaliadas.

Os resultados obtidos neste estudo, em conjunto com outras informações discutidas sobre o envolvimento do estresse do RE na fisiopatologia do THB e sobre a progressão da doença, reforçam a hipótese de que os pacientes bipolares apresentam uma disfunção no RE, visto que os pacientes com THB, diferentemente dos indivíduos saudáveis analisados, não

apresentaram indução dos níveis protéicos de GRP78, eIF2 $\alpha$ -P e CHOP em resposta ao estresse do RE. Esta resposta comprometida parece levar a uma maior suscetibilidade celular a este tipo de estresse no THB, já que a morte celular induzida por tunicamicina foi significativamente maior nos pacientes bipolares comparados aos controles. Além disso, nossos dados sugerem que essa disfunção possa estar associada com a progressão da doença, evidenciado pelas diferenças observadas entre pacientes eutímicos de acordo com o estadiamento, o que poderia contribuir para a carga alostática no THB. Estes novos achados aumentam as perspectivas para outros estudos na área.

## 5. CONCLUSÕES

- O tratamento com tunicamicina induziu o aumento dos níveis protéicos de GRP78 e eIF2 $\alpha$ -P após 12 e 24 h, e de CHOP após 24 h no grupo controle.
- No grupo de pacientes, não houve indução de GRP78, eIF2 $\alpha$ -P e CHOP após 12 e 24 h de tratamento com tunicamicina.
- O tratamento com tunicamicina por 48h induziu a morte celular em ambos os grupos, controles e pacientes, mas a morte celular foi significativamente maior nos pacientes.
- Entre os pacientes eutímicos, aqueles em estágio inicial do transtorno apresentaram aumento dos níveis protéicos de GRP78 e eIF2 $\alpha$ -P após 12 h de tratamento com tunicamicina, o que não ocorreu com os pacientes em estágio avançado. A diferença na morte celular foi maior entre pacientes avançados e controles do que entre controles e pacientes em estágio inicial.
- O estabilizador de humor lítio não alterou significativamente os níveis das proteínas da UPR após a indução do estresse do RE. O lítio também não reverteu a morte celular induzida por tunicamicina, entretanto o fármaco contribuiu um pouco neste último parâmetro, em ambos os grupos avaliados.
- Os resultados obtidos neste trabalho reforçam o envolvimento do estresse do RE na fisiopatologia do THB, sugerindo uma disfunção na resposta ao estresse do RE, principalmente em componentes da via da PERK. Além disso, estes dados sugerem que essa disfunção possa estar associada com a progressão da doença.



## 6. REFERÊNCIAS

Altshuler, L.L., Ventura, J., van Gorp, W.G., Green, M.F., Theberge, D.C., Mintz, J., 2004. Neurocognitive function in clinically stable men with bipolar I disorder or schizophrenia and normal control subjects. *Biol Psychiatry* 56, 560-569.

Andreazza, A.C., Cassini, C., Rosa, A.R., Leite, M.C., de Almeida, L.M., Nardin, P., Cunha, A.B., Cereser, K.M., Santin, A., Gottfried, C., Salvador, M., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., 2007a. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* 41, 523-529.

Andreazza, A.C., Frey, B.N., Erdtmann, B., Salvador, M., Rombaldi, F., Santin, A., Goncalves, C.A., Kapczinski, F., 2007b. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 153, 27-32.

Andreazza, A.C., Kapczinski, F., Kauer-Sant'Anna, M., Walz, J.C., Bond, D.J., Goncalves, C.A., Young, L.T., Yatham, L.N., 2009. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34, 263-271.

Andreazza, A.C., Kauer-Sant'anna, M., Frey, B.N., Bond, D.J., Kapczinski, F., Young, L.T., Yatham, L.N., 2008. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* 111, 135-144.

Barnett, J.H., Smoller, J.W., 2009. The genetics of bipolar disorder. *Neuroscience* 164, 331-343.

Baumeister, P., Luo, S., Skarnes, W.C., Sui, G., Seto, E., Shi, Y., Lee, A.S., 2005. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol* 25, 4529-4540.

Baysal, B.E., Willett-Brozick, J.E., Badner, J.A., Corona, W., Ferrell, R.E., Nimgaonkar, V.L., Detera-Wadleigh, S.D., 2002. A mannosyltransferase gene at 11q23 is disrupted by a translocation breakpoint that co-segregates with bipolar affective disorder in a small family. *Neurogenetics* 4, 43-53.

Belmaker, R.H., 2004. Bipolar disorder. *N Engl J Med* 351, 476-486.

Berk, M., 2009. Neuroprogression: pathways to progressive brain changes in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12, 441-445.

Berk, M., Dodd, S., Kauer-Sant'anna, M., Malhi, G.S., Bourin, M., Kapczinski, F., Norman, T., 2007. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 41-49.

Berk, M., Kapczinski, F., Andreazza, A.C., Dean, O.M., Giorlando, F., Maes, M., Yucel, M., Gama, C.S., Dodd, S., Dean, B., Magalhaes, P.V., Amminger, P., McGorry, P., Malhi, G.S., 2011. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 35, 804-817.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326-332.

Beyer, J.L., Krishnan, K.R., 2002. Volumetric brain imaging findings in mood disorders. *Bipolar Disord* 4, 89-104.

Bown, C.D., Wang, J.F., Chen, B., Young, L.T., 2002. Regulation of ER stress proteins by valproate: therapeutic implications. *Bipolar Disord* 4, 145-151.

Carter, C.J., 2007. Multiple genes and factors associated with bipolar disorder converge on growth factor and stress activated kinase pathways controlling translation initiation: implications for oligodendrocyte viability. *Neurochem Int* 50, 461-490.

Caspi, A., Moffitt, T.E., 2006. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 7, 583-590.

Cenni, E., Ciapetti, G., Granchi, D., Arciola, C.R., Savarino, L., Stea, S., Montanaro, L., Pizzoferrato, A., 1999. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. *Toxicol In Vitro* 13, 801-810.

Cervantes, P., Gelber, S., Kin, F.N., Nair, V.N., Schwartz, G., 2001. Circadian secretion of cortisol in bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 26, 411-416.

Chami, M., Prandini, A., Campanella, M., Pinton, P., Szabadkai, G., Reed, J.C., Rizzuto, R., 2004. Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca<sup>2+</sup> signaling, which do not depend on their putative pore-forming region. *J Biol Chem* 279, 54581-54589.

Chen, B., Wang, J.F., Young, L.T., 2000. Chronic valproate treatment increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Biol Psychiatry* 48, 658-664.

Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., Walter, P., 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18773-18784.

Cunha, A.B., Andreazza, A.C., Gomes, F.A., Frey, B.N., da Silveira, L.E., Goncalves, C.A., Kapczinski, F., 2008. Investigation of serum high-sensitive C-reactive protein levels across all mood states in bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258, 300-304.

Cunha, A.B., Frey, B.N., Andreazza, A.C., Goi, J.D., Rosa, A.R., Goncalves, C.A., Santin, A., Kapczinski, F., 2006. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 398, 215-219.

Deep-Soboslay, A., Iglesias, B., Hyde, T.M., Bigelow, L.B., Imamovic, V., Herman, M.M., Kleinman, J.E., 2008. Evaluation of tissue collection for postmortem studies of bipolar disorder. *Bipolar Disord* 10, 822-828.

Dow, G.S., Caridha, D., Goldberg, M., Wolf, L., Koenig, M.L., Yourick, D.L., Wang, Z., 2005. Transcriptional profiling of mefloquine-induced disruption of calcium homeostasis in neurons in vitro. *Genomics* 86, 539-550.

Doyle, K.M., Kennedy, D., Gorman, A.M., Gupta, S., Healy, S.J., Samali, A., 2011. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med* 15, 2025-2039.

Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., Tschachler, E., 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 722-726.

Frank, C.G., Grubenmann, C.E., Eyaid, W., Berger, E.G., Aebi, M., Hennet, T., 2004. Identification and functional analysis of a defect in the human ALG9 gene: definition of congenital disorder of glycosylation type II. *Am J Hum Genet* 75, 146-150.

Freeze, H.H., 2002. Human disorders in N-glycosylation and animal models. *Biochim Biophys Acta* 1573, 388-393.

Fu, H.Y., Minamino, T., Tsukamoto, O., Sawada, T., Asai, M., Kato, H., Asano, Y., Fujita, M., Takashima, S., Hori, M., Kitakaze, M., 2008. Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res* 79, 600-610.

Gelenberg, A.J., Kane, J.M., Keller, M.B., Lavori, P., Rosenbaum, J.F., Cole, K., Lavelle, J., 1989. Comparison of standard and low serum levels of lithium for maintenance treatment of bipolar disorder. *N Engl J Med* 321, 1489-1493.

Glatt, S.J., Everall, I.P., Kremen, W.S., Corbeil, J., Sasik, R., Khanlou, N., Han, M., Liew, C.C., Tsuang, M.T., 2005. Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15533-15538.

Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., Mori, M., 2004. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* 11, 390-402.

Grande, I., Magalhaes, P.V., Kunz, M., Vieta, E., Kapczinski, F., 2012. Mediators of allostasis and systemic toxicity in bipolar disorder. *Physiol Behav* 106, 46-50.

Hajek, T., Carrey, N., Alda, M., 2005. Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder. *Bipolar Disord* 7, 393-403.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D., 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.

Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.

Harding, H.P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.J., Kaufman, R.J., Ron, D., 2009. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1832-1837.

Hayashi, A., Kasahara, T., Kametani, M., Toyota, T., Yoshikawa, T., Kato, T., 2009. Aberrant endoplasmic reticulum stress response in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12, 33-43.

Helenius, A., Aebi, M., 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-1049.

Hiroi, T., Wei, H., Hough, C., Leeds, P., Chuang, D.M., 2005. Protracted lithium treatment protects against the ER stress elicited by thapsigargin in rat PC12 cells: roles of intracellular calcium, GRP78 and Bcl-2. *Pharmacogenomics J* 5, 102-111.

Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., Tohyama, M., 2004. Involvement of

caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165, 347-356.

Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.

Kakiuchi, C., Ishigaki, S., Osowski, C.M., Fonseca, S.G., Kato, T., Urano, F., 2009. Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One* 4, e4134.

Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Nanko, S., Kunugi, H., Minabe, Y., Nakamura, K., Mori, N., Fujii, K., Umekage, T., Tochigi, M., Kohda, K., Sasaki, T., Yamada, K., Yoshikawa, T., Kato, T., 2005. Functional polymorphisms of HSPA5: possible association with bipolar disorder. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1136-1143.

Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Ishiwata, M., Bundo, M., Kasahara, T., Kusumi, I., Tsujita, T., Okazaki, Y., Nanko, S., Kunugi, H., Sasaki, T., Kato, T., 2003. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet* 35, 171-175.

Kapczinski, F., Dal-Pizzol, F., Teixeira, A.L., Magalhaes, P.V., Kauer-Sant'Anna, M., Klamt, F., Moreira, J.C., de Bittencourt Pasquali, M.A., Fries, G.R., Quevedo, J., Gama, C.S., Post, R., 2011. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 45, 156-161.

Kapczinski, F., Dias, V.V., Kauer-Sant'Anna, M., Brietzke, E., Vazquez, G.H., Vieta, E., Berk, M., 2009a. The potential use of biomarkers as an adjunctive tool for staging bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 1366-1371.

Kapczinski, F., Dias, V.V., Kauer-Sant'Anna, M., Frey, B.N., Grassi-Oliveira, R., Colom, F., Berk, M., 2009b. Clinical implications of a staging model for bipolar disorders. *Expert Rev Neurother* 9, 957-966.

Kapczinski, F., Vieta, E., Andreazza, A.C., Frey, B.N., Gomes, F.A., Tramontina, J., Kauer-Sant'anna, M., Grassi-Oliveira, R., Post, R.M., 2008. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 675-692.

Kato, T., 2008. Role of mitochondrial DNA in calcium signaling abnormality in bipolar disorder. *Cell Calcium* 44, 92-102.

Kauer-Sant'Anna, M., Kapczinski, F., Andreazza, A.C., Bond, D.J., Lam, R.W., Young, L.T., Yatham, L.N., 2009. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12, 447-458.

Kaufman, R.J., 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110, 1389-1398.

Keck, P.E., Jr., McElroy, S.L., Strakowski, S.M., 1998. Anticonvulsants and antipsychotics in the treatment of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 59 Suppl 6, 74-81; discussion 82.

Kelsoe, J.R., 2003. Arguments for the genetic basis of the bipolar spectrum. *J Affect Disord* 73, 183-197.

Kessing, L.V., Andersen, P.K., Mortensen, P.B., 1998. Predictors of recurrence in affective disorder. A case register study. *J Affect Disord* 49, 101-108.



Kimata, Y., Kohno, K., 2011. Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 23, 135-142.

Kupfer, D.J., 2005. The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA* 293, 2528-2530.

Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A., 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22, 193-201.

Lopez, A.D., Murray, C.C., 1998. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 4, 1241-1243.

Lyoo, I.K., Sung, Y.H., Dager, S.R., Friedman, S.D., Lee, J.Y., Kim, S.J., Kim, N., Dunner, D.L., Renshaw, P.F., 2006. Regional cerebral cortical thinning in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 8, 65-74.

Ma, T., Han, L., Gao, Y., Li, L., Shang, X., Hu, W., Xue, C., 2008. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis. *Eur Surg Res* 41, 219-225.

Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18, 3066-3077.

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21, 1249-1259.

McCurdy, R.D., Feron, F., Perry, C., Chant, D.C., McLean, D., Matigian, N., Hayward, N.K., McGrath, J.J., Mackay-Sim, A., 2006. Cell cycle alterations in biopsied olfactory neuroepithelium in schizophrenia and bipolar I disorder using cell culture and gene expression analyses. *Schizophr Res* 82, 163-173.

McEwen, B.S., 2000. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 22, 108-124.

McIntyre, R.S., Konarski, J.Z., Misener, V.L., Kennedy, S.H., 2005. Bipolar disorder and diabetes mellitus: epidemiology, etiology, and treatment implications. *Ann Clin Psychiatry* 17, 83-93.

Merikangas, K.R., Jin, R., He, J.P., Kessler, R.C., Lee, S., Sampson, N.A., Viana, M.C., Andrade, L.H., Hu, C., Karam, E.G., Ladea, M., Medina-Mora, M.E., Ono, Y., Posada-Villa, J., Sagar, R., Wells, J.E., Zarkov, Z., 2011. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry* 68, 241-251.

Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., Yasuhiko, Y., 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277, 34287-34294.

Nakagawa, T., Yuan, J., 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-894.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J., 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Naydenov, A.V., MacDonald, M.L., Ongur, D., Konradi, C., 2007. Differences in lymphocyte electron transport gene expression levels between subjects with bipolar disorder and normal controls in response to glucose deprivation stress. *Arch Gen Psychiatry* 64, 555-564.

Ni, M., Zhang, Y., Lee, A.S., 2011. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* 434, 181-188.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H., 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16, 1345-1355.

Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., Ichijo, H., 1998. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* 2, 389-395.

Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., Mori, K., 2002. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366, 585-594.

Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., Mori, M., 2002. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109, 525-532.

Oyadomari, S., Mori, M., 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11, 381-389.

Ozcan, L., Tabas, I., 2012. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med* 63, 317-328.

Paschen W., Mengesdorf T., 2005. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38:409-15.

Price, N.P., Tsvetanova, B., 2007. Biosynthesis of the tunicamycins: a review. *J Antibiot (Tokyo)* 60, 485-491.

Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 514, 122-128.

Rosa, A.R., Gonzalez-Ortega, I., Gonzalez-Pinto, A., Echeburua, E., Comes, M., Martinez-Aran, A., Ugarte, A., Fernandez, M., Vieta, E., 2012. One-year psychosocial functioning in patients in the early vs. late stage of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand*.

Roth, J., Zuber, C., Park, S., Jang, I., Lee, Y., Kysela, K.G., Le Fourn, V., Santimaria, R., Guhl, B., Cho, J.W., 2010. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells* 30, 497-506.

Rutkowski, D.T., Kaufman, R.J., 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14, 20-28.

Sasson, Y., Chopra, M., Harrari, E., Amitai, K., Zohar, J., 2003. Bipolar comorbidity: from diagnostic dilemmas to therapeutic challenge. *Int J Neuropsychopharmacol* 6, 139-144.

Schloesser, R.J., Huang, J., Klein, P.S., Manji, H.K., 2008. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 33, 110-133.

Schroder, M., 2006. The unfolded protein response. *Mol Biotechnol* 34, 279-290.

Schroder, M., Kaufman, R.J., 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569, 29-63.

Schuepbach, D., Novick, D., Haro, J.M., Reed, C., Boeker, H., Noda, S., Angst, J., Hell, D., 2008. Determinants of voluntary vs. involuntary admission in bipolar disorder and the impact of adherence. *Pharmacopsychiatry* 41, 29-36.

Shaltiel, G., Chen, G., Manji, H.K., 2007. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol* 7, 22-26.

Shang, J., Korner, C., Freeze, H., Lehrman, M.A., 2002. Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology* 12, 307-317.

Shao, L., Sun, X., Xu, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2006. Mood stabilizing drug lithium increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in primary cultured rat cerebral cortical cells. *Life Sci* 78, 1317-1323.

So, J., Warsh, J.J., Li, P.P., 2007. Impaired endoplasmic reticulum stress response in B-lymphoblasts from patients with bipolar-I disorder. *Biol Psychiatry* 62, 141-147.

Stacey, G., MacDonald, C., 2001. Immortalisation of primary cells. *Cell Biol Toxicol* 17, 231-246.

Stork, C., Renshaw, P.F., 2005. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry* 10, 900-919.

Strakowski, S.M., Delbello, M.P., Adler, C.M., 2005. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry* 10, 105-116.

Strakowski, S.M., DelBello, M.P., Zimmerman, M.E., Getz, G.E., Mills, N.P., Ret, J., Shear, P., Adler, C.M., 2002. Ventricular and periventricular structural volumes in first- versus multiple-episode bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 159, 1841-1847.

Sugimoto, M., Tahara, H., Ide, T., Furuichi, Y., 2004. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* 64, 3361-3364.

Sullivan, P.F., Fan, C., Perou, C.M., 2006. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B, 261-268.

Swann, A.C., Bowden, C.L., Calabrese, J.R., Dilsaver, S.C., Morris, D.D., 1999. Differential effect of number of previous episodes of affective disorder on response to lithium or divalproex in acute mania. *Am J Psychiatry* 156, 1264-1266.

Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184-190.

Tohen, M., Waternaux, C.M., Tsuang, M.T., 1990. Outcome in Mania. A 4-year prospective follow-up of 75 patients utilizing survival analysis. *Arch Gen Psychiatry* 47, 1106-1111.

Tordai, A., Brass, L.F., Gelfand, E.W., 1995. Tunicamycin inhibits the expression of functional thrombin receptors on human T-lymphoblastoid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 857-862.

Torres, I.J., Boudreau, V.G., Yatham, L.N., 2007. Neuropsychological functioning in euthymic bipolar disorder: a meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 17-26.

Treiman, M., Caspersen, C., Christensen, S.B., 1998. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol Sci* 19, 131-135.

Tsaytler, P., Harding, H.P., Ron, D., Bertolotti, A., 2011. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* 332, 91-94.

Tseng, M., Alda, M., Xu, L., Sun, X., Wang, J.F., Grof, P., Turecki, G., Rouleau, G., Young, L.T., 2008. BDNF protein levels are decreased in transformed lymphoblasts from lithium-responsive patients with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 33, 449-453.

Uranova, N., Orlovskaya, D., Vikhreva, O., Zimina, I., Kolomeets, N., Vostrikov, V., Rachmanova, V., 2001. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 55, 597-610.

Vieta, E., Colom, F., Martinez-Aran, A., Benabarre, A., Gasto, C., 1999. Personality disorders in bipolar II patients. *J Nerv Ment Dis* 187, 245-248.

Vieta, E., Reinares, M., Rosa, A.R., 2011. Staging bipolar disorder. *Neurotox Res* 19, 279-285.

Walter, P., Ron, D., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086.

Walz, J.C., Andreazza, A.C., Frey, B.N., Cacilhas, A.A., Cereser, K.M., Cunha, A.B., Weyne, F., Stertz, L., Santin, A., Goncalves, C.A., Kapczinski, F., 2007. Serum neurotrophin-3 is increased during manic and depressive episodes in bipolar disorder. *Neurosci Lett* 415, 87-89.

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

Wang, J.F., Young, L.T., 2004. Regulation of molecular chaperone GRP78 by mood stabilizing drugs. *Clinical Neuroscience Research* 4, 281-288.

Warsh, J.J., Andreopoulos, S., Li, P.P., 2004. Role of intracellular calcium signaling in the pathophysiology and pharmacotherapy of bipolar disorder: current status. *Clinical Neuroscience Research* 4, 201-213.

Washizuka, S., Kakiuchi, C., Mori, K., Tajima, O., Akiyama, T., Kato, T., 2005. Expression of mitochondria-related genes in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 7, 146-152.

Yatham, L.N., Kennedy, S.H., O'Donovan, C., Parikh, S., MacQueen, G., McIntyre, R., Sharma, V., Silverstone, P., Alda, M., Baruch, P., Beaulieu, S., Daigneault, A., Milev, R.,



Young, L.T., Ravindran, A., Schaffer, A., Connolly, M., Gorman, C.P., 2005. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies. *Bipolar Disord* 7 Suppl 3, 5-69.

Yatham, L.N., Lyoo, I.K., Liddle, P., Renshaw, P.F., Wan, D., Lam, R.W., Hwang, J., 2007. A magnetic resonance imaging study of mood stabilizer- and neuroleptic-naive first-episode mania. *Bipolar Disord* 9, 693-697.

Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., Tohyama, M., 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276, 13935-13940.

Zarate, C.A., Jr., Tohen, M., Land, M., Cavanagh, S., 2000. Functional impairment and cognition in bipolar disorder. *Psychiatr Q* 71, 309-329.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D., 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12, 982-995.

## ANEXO A

Instruções para a submissão de manuscritos na revista *Biological Psychiatry*.

# **BIOLOGICAL PSYCHIATRY**

*A Journal of Psychiatric Neuroscience and Therapeutics*

## **Guide for Authors**

*Biological Psychiatry* is the official journal of the Society of Biological Psychiatry. The Journal rapidly publishes reports of novel results on a broad range of topics related to the pathophysiology and treatment of major neuropsychiatric disorders. Both basic and clinical neuroscience contributions are encouraged, particularly those addressing genetic and environmental risk factors, neural circuitry and neurochemistry, and important new therapeutic approaches.

All new manuscripts must be submitted through the journal web site: external link <http://ees.elsevier.com/bps>. Please direct questions to the Editorial Office at (214) 648-0880, or [Biol.Psych@utsouthwestern.edu](mailto:Biol.Psych@utsouthwestern.edu).

Except where explicitly stated otherwise, *Biological Psychiatry* conforms to the guidelines set forth by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (see Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (April 2010): Available from external link <http://www.ICMJE.org>).

## **ARTICLE CONTENT**

Our readership is diverse, and authors should consider that many of our readers are in specialty areas other than their own. It is important, therefore, to avoid jargon. A focused and clearly written manuscript is more likely to appeal to the readership. The brevity and clarity of the presentation will be taken into consideration by the Editors. In highly specialized areas, the introduction should be a concise primer.

Article Type and Content	Abstract Word Length	Article Word Length <sup>a</sup>	Figures and Tables	References
<b>Archival Reports</b> are original research papers reporting novel results on a broad range of topics related to the pathophysiology and treatment of major neuropsychiatric disorders. The Methods and Results sections should be the central focus of these papers, allowing for their maximal impact.	250	4000	As required	As required
<b>Priority Communications</b> are Archival Reports that clearly document novel experimental findings of unusual and timely significance. These papers should represent a conceptual advance in the field and are not intended for publication of preliminary results. They are expected to be acceptable for publication in essentially the form submitted. Papers that require substantial revisions or do not fit the criteria will be considered as Archival Reports.	250	4000	As required	As required
<b>Reviews</b> are concise, and focus on current aspects of interest and research.	250	4000	1 typeset page	Limited to 100
<b>Techniques and Methods</b> articles feature new, improved, or noteworthy comments about techniques or methods relevant to basic or clinical research in, or treatment of, psychiatric disorders.	150	1500	To illustrate important points; limited to ½ page	As required
<b>Correspondence</b> is directly related to methods, procedures or interpretation of data presented in work recently published in our journal and uses new analysis of data presented, the support of previously published work, and/or scientific points to be addressed based on methodological issues. It may also present a case-report that clearly and unambiguously illustrates important new principals that have not yet been demonstrated in clinical trials. When warranted, a reply from author(s) of the original work is solicited. Correspondence is published online only as e-content.	No abstract	1000	Not encouraged; allowed to illustrate important points	As required
<b>Commentaries and Editorials</b> address points directly related to articles in the concurrent issue, and/or focus on topics of current research and interest. These are generally invited, but interested contributors are encouraged to contact the Editor.	No abstract	1500	A summarizing figure or table is encouraged	Limited to 10

<sup>a</sup> Article word length excludes abstract, acknowledgments, financial disclosures, legends, and references.

## PREPARATION & SUBMISSION REQUIREMENTS

All manuscripts must be submitted in electronic form through the *Biological Psychiatry* online submission and review web site (external link <http://ees.elsevier.com/bps/> ). Submission is a representation that all authors have personally reviewed and given final approval of the version submitted, and neither the manuscript nor its data have been previously published (except in abstract) or are currently under consideration for publication elsewhere. Authors must identify figures, tables, and/or data that have been published elsewhere, and permission from the copyright holder must be obtained to reproduce or modify the materials.

Files (cover letter, text, figures) will be uploaded separately during the submission process, and should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.eps, Table3.doc). The system will then build a single PDF of the submission from the uploaded files.

Upon finalizing the submission, the corresponding author will immediately receive an e-mail notification that the submission has been received by the Editorial Office. If such documentation has not been received, then a problem likely occurred during the submission process and should be investigated. Any manuscripts not conforming to these guidelines will be returned to the author for correction before the manuscript is processed. The manuscript status is available to the corresponding author at all times by logging into the website.

The Publisher and Editors regret that they are not able to consider submissions that do not follow these procedures.

### **COVER LETTER**

A cover letter is required for Priority Communications to outline the significance of the work; it is optional for all other submissions. A cover letter should be uploaded as a separate file.

### **MANUSCRIPT**

Manuscripts should be double-spaced. Pages should be numbered consecutively and include the first author's name. Acronyms must be spelled out on first use in text, and where used in tables or figures, in each of their legends.

Manuscripts for Archival Reports should be structured with sections entitled and ordered as follows: Title Page, Abstract, Introduction, Methods and Materials, Results, Discussion, Acknowledgments, Financial Disclosures, References, Footnotes, Table/Figure Legends, and Appendices. Begin sections for reference lists, footnotes, and legends on separate pages. The manuscript file may also include tables if they were created in the same text format and are not imported into the document. The manuscript file should be uploaded in its native format, such as DOC. Do not upload any text files in PDF or XLS format.

*Title Page* On the title page, include the full names of all authors and their academic or professional affiliations, along with the corresponding author's complete contact information. Multiple corresponding authors are not allowed. Six key words should also be included. Separately list the number of words in both the abstract and article body (excluding abstract, acknowledgments, financial disclosures, legends and references), and the number of figures, tables, and supplemental information (if zero, state zero for each item). Article titles should not contain acronyms, and be less than 100 characters.

*Abstracts* Abstracts for Archival Reports should be structured with sections entitled as follows: Background, Methods, Results, Conclusions. Abstracts for all other article types are unstructured, but should not exceed the word limits as defined above. The Methods section should explicitly state the sample size of the trial. For those manuscripts that require clinical trials registration (see Clinical Trials Registration section, below), the registry name, URL, and registration number should be included at the end of the abstract.

*Acknowledgments* This section should follow the Discussion and precede the References, and should include acknowledgments for personal and technical assistance, in addition to detailed information regarding all sources of grant and other material or financial support. If a research group is listed as an author, then the individual members of the research team must be named here. Written permission should be obtained from all individuals named here. Data that was published previously, such as in an abstract or poster, should be identified here.

*Financial Disclosures* This section must include the required conflict of interest statements for each author (see section on disclosure, below).

## **References**

References should be numbered and listed by their order of appearance in the text. Refer to references in the text with the appropriate number in parentheses. References in tables and figures should also be numbered. List all authors; if there are more than seven authors, list the first six then et al. Periodical abbreviations should follow those used by Index Medicus. The following are sample references for a journal article (1), a book (2), and an edited book (3).

1. Krystal JH, Carter CS, Geschwind D, Manji HK, March JS, Nestler EJ, et al. (2008): It is time to take a stand for medical research and against terrorism targeting medical scientists. *Biol Psychiatry* 63: 725-727.

2. American Psychiatric Association (1994): *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.

3. Martin JH (1985): Properties of cortical neurons, the EEG, and the mechanisms of epilepsy. In: Kandel ER, Schwartz JH, editors. *Principles of Neural Science*, 2nd ed. New York: Elsevier, pp 461-471.

## **FIGURES AND TABLES**

Figures and tables should be cited in the text, numbered consecutively (i.e., 1, 2, 3) in the order of their mention, and have brief descriptions. If not included in the manuscript file, tables should be uploaded individually in a text format, such as DOC.

The preferred file format for figures and graphics is EPS, TIFF, or PDF. Please upload each figure individually (i.e., two figures should be uploaded separately as Figure 1 and Figure 2). Parts/panels in composite figures should be labeled with capital letters (A, B, C). Figures

should be consistent in color, size, and font, and be designed proportionally so that each item within it is to scale (particularly numbers, letters, and symbols) so it can later be sized as needed without loss of legibility or quality. Complete instructions for electronic artwork preparation and submission can be found at <http://www.elsevier.com/artwork>.

## **SUPPLEMENTAL INFORMATION**

Supplemental information, relevant to the work but not critical to support the findings, is strongly encouraged by the Journal and is made available via links in the online article but not published in print. All such material is peer-reviewed, but not typeset or proofed and so should be carefully prepared. Unlike other files, all supplemental information (including text, tables, and figures) should be uploaded in a single DOC file. Supplementary figures and tables should appear with their legends/keys, and be numbered consecutively (i.e., S1, S2). References should be included as a separate list from the references in the main manuscript file. Multiple supplemental files are allowed, but for the ease of readership, authors should use a single file when possible. The CONSORT diagram and checklist for randomized controlled trials will be published as supplemental information. Multimedia content, in formats such as AVI or MPG, can also be included as a supplement.

## **REFEREE SUGGESTIONS**

For all new submissions (except Editorials, Commentaries, and Correspondence), authors will be required to include the full names and contact information (affiliation, e-mail, and telephone number) of 6 individuals who are especially qualified to referee the work and would not have a conflict of interest in reviewing the manuscript. Affiliations of the suggested referees should all be different, and none should have the same affiliation as any of the authors. Editors are not appropriate to suggest as a reviewer.



## **MANUSCRIPT SUBMISSION FORM (MSF)**

A properly completed and signed MSF from each author should accompany submission of a new manuscript. Updated MSFs are required if the author list or the Acknowledgments or Financial Disclosures sections have changed. Acceptance of a manuscript cannot be finalized until MSFs from all authors have been received and verified. Forms with signatures "on behalf of" or "for" other authors will not be accepted. Authors who are not allowed to transfer copyright must still complete this form. Authors with the ability to scan their forms may upload them during the submission process. Alternatively, authors may return the completed forms to the Editorial Office by fax at (214) 648-0881. The author must then indicate during the submission process that the MSFs are being sent off-line.

## **REVISIONS**

Revised manuscripts should not show or include "tracked changes." Authors should prepare a unique file (separate from the cover letter) with responses to reviewers' comments. In addition, the submission of revised manuscripts (except Editorials, Commentaries, and Correspondence) will require a new unique file with a brief summary for the Journal feature, In This Issue. The blurb should be uploaded as a text file, 50-75 words in length, and be written in laymen's terms. If revisions are a condition of publication, only two revised versions of the paper will be considered.

## **COVER ART**

*Biological Psychiatry* generally selects cover art relevant to an article appearing in that issue. The Journal encourages the submission of scientifically and visually interesting images that do not appear in the paper, but that would be suitable for cover art, particularly those that summarize or represent the article's findings. Authors may upload images to be considered for the cover during the submission process, or e-mail them separately to the Editorial Office.

Any such images must be the property of the submitting authors. Figures that appear in the paper are automatically considered for covers.

## **REVIEW PROCESS**

The actual selection of reviewers will be made by the editors. As a general rule, papers will be evaluated by three independent reviewers and, on occasion, an additional review for statistical adequacy may also be obtained. The comments of the reviewers are generally communicated to the authors within 30-45 days of submission. Authors should contact the Editorial Office if the delay has been longer.

*Biological Psychiatry* excludes reviewers who work at the same institution as any author, or those who have any other obvious conflict of interest. The identity of individual reviewers remains confidential to all parties except the Editorial Office. Reviewers are expected to treat manuscripts under peer review with the strictest confidentiality.

Authors should be aware that manuscripts may be returned without outside review when the editors deem that the paper is of insufficient general interest for the broad readership of *Biological Psychiatry*, or that the scientific priority is such that it is unlikely to receive favorable reviews. Editorial rejection is done to speed up the editorial process and to allow the authors' papers to be promptly submitted and reviewed elsewhere. All submissions (with the general exception of Editorials, Commentaries, and Correspondence) will be subject to peer review.

## **DISCLOSURE OF BIOMEDICAL FINANCIAL INTERESTS AND POTENTIAL**

**CONFLICTS OF INTEREST** *Biological Psychiatry* requires all authors to provide full disclosure of any and all biomedical financial interests. Further, we require all authors for all

article types to specify the nature of potential conflicts of interest, financial or otherwise. This disclosure includes direct or indirect financial or personal relationships, interests, and affiliations relevant to the subject matter of the manuscript that have occurred over the last two years, or that are expected in the foreseeable future. This disclosure includes, but is not limited to, grants or funding, employment, affiliations, patents (in preparation, filed, or granted), inventions, honoraria, consultancies, royalties, stock options/ownership, or expert testimony. This policy of full disclosure is similar to the policies of the ICMJE, the Journal of the American Medical Association, and other such organizations. The conflict of interest statements should be included in the Financial Disclosures section of the manuscript at the time of submission for all article types. If an author has nothing to declare, this must be explicitly stated. Authors should contact the Editorial Office with questions or concerns, but should err on the side of inclusion when in doubt. The following is a sample text:

Dr. Einstein reports having received lecture fees from EMC Laboratories, and research funding from Quantum Enterprises. Dr. Curie disclosed consulting fees from RA Inc. Dr. Newton reported his patent on "Newtonian physics". Dr. Archimedes reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

All authors are required to acknowledge that the conflicts of interest and financial disclosures are complete for both themselves and their co-authors, to the best of their knowledge, when completing the Manuscript Submission Form. Manuscripts that fail to include the complete statements of all authors upon submission will be returned to the corresponding author and will delay the processing and evaluation of the manuscript.

**ETHICAL CONSIDERATIONS** Authors should consider all ethical issues relevant to their research. In the Methods and Materials section of the manuscript, authors should identify the

institutional and/or licensing committee that approved the experiment(s) and confirm that all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Authors of reports on human studies should include detailed information on the informed consent process, including the method(s) used to assess the subject's capacity to give informed consent, and safeguards included in the study design for protection of human subjects. When relevant patient follow-up data are available, this should also be reported. When reporting experiments on animals, authors should indicate that institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

*Biological Psychiatry* takes seriously its responsibility in ensuring scientific integrity, and will pursue any allegations of misconduct, including but not limited to plagiarism, duplicate submission or publication, data fabrication or falsification, unethical treatment of research subjects, authorship disputes, and undisclosed conflicts of interest. The Journal generally follows the guidelines recommended by the Committee on Publication Ethics (external link <http://publicationethics.org/>), although we also reserve the right to take alternative action(s) as deemed necessary, including contacting the authors' institution(s), funding agency, or other appropriate authority for investigation. Literature corrections, via errata or retractions, are handled on a case-by-case basis.

**CLINICAL TRIALS REGISTRATION** In concordance with the ICMJE, *Biological Psychiatry* requires the registration of all clinical trials whose primary purpose is to affect clinical practice as a condition of submission and consideration for publication. For this purpose, a clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example, drugs, surgical procedures,

devices, behavioral treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

All clinical trials, regardless of when they were completed, and secondary analyses of original clinical trials must be registered before submission of a manuscript based on the trial. Trials must have been registered at or before the onset of patient enrollment for any clinical trial that began patient enrollment on or after February 1, 2007. The trial name, URL, and registration number should be included at the end of the abstract. In addition to any primary registries that participate in the World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP), *Biological Psychiatry* considers the following trial registries acceptable:

- Australian New Zealand Clinical Trials Registry: external link <http://actr.org.au>
- U.S. National Institutes of Health ClinicalTrials.gov: external link <http://www.clinicaltrials.gov>
- ISRCTN Register external link <http://isrctn.org>
- Netherlands Trial Register external link <http://www.trialregister.nl>
- UMIN Clinical Trials Registry external link <http://www.umin.ac.jp/ctr>

**RESEARCH AND DATA REPORTING GUIDELINES** *Biological Psychiatry* supports initiatives aimed at improving the reporting of biomedical research. Checklists have been developed for a number of study designs, including randomized controlled trials (CONSORT), systematic reviews (PRISMA), meta-analyses of observational studies (MOOSE), and diagnostic accuracy studies (STARD). The Minimum Information for

Biological and Biomedical Investigations (MIBBI) portal also provides data-reporting standards, such as MIAME for microarray experiments. A comprehensive list of reporting guidelines is available from the EQUATOR Network Library (external link <http://www.equator-network.org>). Authors should make use of the appropriate guidelines when drafting their papers. Peer reviewers are asked to refer to these checklists when evaluating these studies.

*Biological Psychiatry* requires the inclusion of the CONSORT materials (flow diagram and checklist) at submission for all randomized controlled trials. Authors of other study designs are encouraged, but not required, to include the relevant checklists at submission. All such materials will be published as supplemental information.

**GENETIC ASSOCIATION STUDIES** The ability to perform a replication of experiments performed by other investigators is a fundamental concept in scientific and biomedical research. Therefore, the failure to replicate the majority of genetic association studies is troubling and provides a challenge for journals attempting to publish work that will stand the test of time, or at the very least, not lead other investigators in non-productive research directions. At the same time, the difficulty in balancing type I error with type II error is a key issue in association studies of neuropsychiatric disease, where sample sizes are often constrained by practicality and the fact that effect sizes due to any single genetic risk factor may be small. Given these tradeoffs, it is often difficult for authors to know what level of proof is acceptable for publication in a given journal, leading to multiple resubmissions and publication delays. We have adopted the following editorial policies to provide guidelines for those submitting manuscripts involving genetic association studies.

*Biological Psychiatry* is interested in Genetics/Association studies that are replicable and generalizable. The following guidelines are offered in pursuit of this goal. (1) Studies need to be sufficiently large. (2) Information about subject ethnicity, and how it was determined, should be provided. The use of an analytic strategy that controls for potential stratification, such as family-controlled association, or structured association, is encouraged. (3) There must be a clear description of how the phenotype was ascertained. (4) Negative studies should always include estimates of power.

We realize that independent replication of an initial finding in the same manuscript may not be feasible in every case, but studies providing such replication of findings in an independent sample will be given highest priority. Confirmation of the functional consequences of a common disease-associated variant is useful information, but does not substitute for a rigorous demonstration of a statistically significant association. Analysis of pathways or candidate regional analysis is encouraged over single gene studies. Candidate gene studies must have strong positional or biological rationale or precedents in the literature that motivate gene choice.

For studies of anonymous variants, there should generally be sufficiently dense marker coverage to allow a relatively comprehensive analysis of common variants within a gene or genes. Analysis of the extent of marker coverage using standard methods to assess linkage disequilibrium should be presented. If rare variants are being tested, the same method of assessment (sequencing, copy number assessment, etc.) should be used in both case and control groups.

We will consider both negative and positive association studies, as well as large replication studies. Negative studies should be based on an attempt to replicate previous studies. Power

calculations considering reasonable effect sizes must be provided to show that the study had sufficient power to be informative.

**MATERIALS AND GENES** Upon publication, it is expected that authors willingly distribute to qualified academic researchers any materials (such as viruses, organisms, antibodies, nucleic acids and cell lines) that were utilized in the course of the research and that are not commercially available.

GenBank/EMBL accession numbers for primary nucleotide and amino acid sequence data should be included in the manuscript at the end of the Methods and Materials section. All microarray data (proteomic, expression arrays, chromatin arrays, etc.) must be deposited in the appropriate public database and must be accessible without restriction from the date of publication. An entry name or accession number must be included in the Methods and Materials section.

Authors should use approved nomenclature for gene symbols by consulting the appropriate public databases for correct gene names and symbols. Please use symbols (e.g., SLC6A4, DISC1) as opposed to italicized full names, and avoid listing multiple names separated by a slash, such as 'Oct4/Pou5f1'. Use one name throughout and include any alias(es) upon the first reference. Approved human gene symbols are available from HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) at external link <http://www.genenames.org/>. Approved mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory at external link <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen>. Authors should submit proposed gene names that are not already approved to the appropriate nomenclature committees as soon as possible. It is the authors' responsibility to ensure these are deposited and approved before publication of an article.



**REPOSITORY DATA** A growing number of private and public repositories are accumulating demographic and clinical data, genetic and genetic analysis data, DNA, and other biomaterials for use in medical research. Manuscripts submitted for publication in *Biological Psychiatry* that employ repository data and/or biomaterials must be in full compliance with the rules developed by the respective repository governing the correct citation of the repository, funding agencies, and investigators who contributed to the repository. Any other stipulation by the repository governing publications using repository data and/or biomaterials must also be followed. Authors must provide sufficient information in the manuscript for the Editor and reviewers to determine that these conditions have been met and that the repository has been established and maintained according to current ethical standards. The Editors may require authors to provide additional documentation regarding the repository during the review process.

**CORRESPONDING AUTHOR** By electing to approve and finalize the submission of a manuscript as the corresponding author, *Biological Psychiatry* assumes the author's acknowledgment and acceptance of the following responsibilities: (1) act as the sole correspondent with the Editorial Office and the publisher, Elsevier, on all matters related to the submission, including review and correction of the typeset proof; (2) assurance that all individuals who meet the criteria for authorship are included as authors on the manuscript title page, and that the version submitted is the version that all authors have approved; and (3) assurance that written permission has been received from all individuals whose contributions to the work are included in the Acknowledgments section of the manuscript, with the exception of individuals that are listed in their capacity as members of a Research Group. To qualify for authorship, an individual must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for all or part of the content, and made substantive intellectual contributions to the submitted work in the form of: (1) conception and design, and/or

acquisition of data, and/or analysis of data; and (2) drafting the article, and/or revising it critically for important intellectual content.

**PUBLIC ACCESS POLICY** Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with manuscript archiving requirements of multiple funding bodies in the US and UK, including the National Institutes of Health and Wellcome Trust. Please see the full details at [www.elsevier.com/fundingbodyagreements](http://www.elsevier.com/fundingbodyagreements).

**PUBLICATION** Abstracts of articles are posted on our website upon acceptance, with the complete (citable) article published online approximately 45 days later, after author verification. Articles generally appear in the journal within 6 months of acceptance, with most being published in 4-5 months.

Color illustrations are accepted. Although the cost of color printing must be paid by the author, authors may choose, at no cost, for illustrations to be reproduced in black and white in the print journal and appear in color for the online version. Color illustrations are printed at a rate of \$650 (US dollars) for the first figure, and \$100 for each additional figure.

*Biological Psychiatry* accepts the date of online publication ("published online day/month/year") as the embargo date for all published manuscripts.

**PROOFS AND REPRINTS** The corresponding author will receive proofs by e-mail generally within 4 weeks of acceptance, which must be corrected and returned within 48 hours of receipt. Authors should carefully review and proofread the entire article for accuracy, as the Editorial Office does not participate in the proofing of articles. Reprints may be ordered

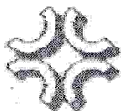
prior to publication using a reprint form provided by the publisher. Reprints will be sent approximately eight weeks following publication in the printed journal.

**COPYRIGHT** Upon acceptance of an article by the Journal, the corresponding author will be asked to transfer copyright to the Society of *Biological Psychiatry* on behalf of all authors. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information under U.S. Copyright Law. All copies, paper or electronic, or other use of information must include an indication of the Elsevier Inc. and Society of *Biological Psychiatry* copyright and full citation of the journal source. All requests for other uses will be handled through Elsevier Inc.

Authors retain the following rights: 1) Patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the article. 2) The right to photocopy or make single electronic copies of the article for their own personal use, including for their own classroom use, or for the personal use of colleagues, provided the copies are not offered for sale and are not distributed in a systematic way outside of their employing institution (e.g. via an e-mail list or public file server). Posting of the article on a secure network (not accessible to the public) within the author's institute is permitted. However, if a prior version of this work (normally a preprint) has been posted to an electronic public server, the author(s) agree not to update and/or replace this prior version on the server in order to make it identical in content to the final published version, and further that posting of the article as published on a public server can only be done with Elsevier's written permission. 3) The right, subsequent to publication, to use the article or any part thereof free of charge in a printed compilation of works of their own, such as collected writings or lecture notes, in a thesis, or to expand the article into book-length form for publication. Please see the Journal Publishing Agreement for full details.

## **ANEXO B**

Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 100191

**Versão do Projeto:** 06/07/2010

**Versão do TCLE:** 07/12/2010

**Pesquisadores:**

BIANCA PFAFFENSELLER

FLAVIO KAPCZINSKI

**Título:** AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETICULO ENDOPLASMÁTICO EM CULTURAS DE LINFÓCITOS DE PACIENTES COM TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR E O EFEITO DE ESTABILIZADORES DO HUMOR NESTE PROCESSO CELULAR

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 08 de dezembro de 2010.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

## **ANEXO C**

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para Controles e Pacientes.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES

Nome do participante:

Data de Nascimento:

Pesquisador Supervisor: *Flávio Kapczinski*

Pesquisador Executor: *Bianca Pfaffenseller*

Esta é uma pesquisa, realizada por pesquisadores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para identificar os níveis de algumas proteínas que podem estar alteradas nos indivíduos portadores de Transtorno de Humor Bipolar. É necessário estudar um grupo de pessoas que não possuam a doença para comparar com o grupo de pacientes portadores de Transtorno de Humor Bipolar; sendo assim, você está sendo convidado a participar como controle (sem Transtorno de Humor Bipolar). A participação envolve uma coleta de sangue (10 mL) que será armazenado, para fins desta pesquisa, e essas proteínas serão avaliadas em conjunto com alguns dados coletados dos controles. Assim, o benefício de participar desta pesquisa é nos auxiliar a melhor compreender como esta doença afeta o organismo, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Os riscos envolvidos nesta pesquisa são um mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores do PROTAHBI, sendo estes dados utilizados apenas para esta pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada.

Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto do benefício esperado. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa de acordo com estas informações, sem que isto traga prejuízo ao atendimento que eu

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA  
08.11.2010  
nº 100191 SB

possa estar recebendo ou venha a receber na instituição ou meu familiar.

Fui informado que caso existam danos à minha pessoa ou saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei facilitado meu acesso a tratamento médico adequado.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

Nome do voluntário:

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Nome do pesquisador:

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com o participante e a outra arquivada pelo pesquisador.

Em caso de qualquer outra dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve ou sobre os seus direitos, você deverá contatar a pesquisadora Bianca Pfaffenseller, pelo telefone: (51) 3359-8845.

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA  
08/12/2010  
nº 10019185



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Nome do participante:

Data de Nascimento:

Pesquisador Supervisor: *Flávio Kapczinski*

Pesquisador Executor: *Bianca Pfaffenseller*

Antes de participar deste estudo, que ocorre no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer outra dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve ou sobre os seus direitos, você deverá contatar o médico Flávio Kapczinski pelo telefone: (51) 3359-8845.

Esta é uma pesquisa para identificar os níveis de algumas proteínas que podem estar alteradas nos indivíduos portadores de Transtorno de Humor Bipolar. Você que já é paciente do Programa de Atendimento do Transtorno de Humor Bipolar (PROTAHBI) será convidado a participar dessa pesquisa, através da coleta de uma amostra de sangue (10 mL). O sangue coletado será armazenado, para fins dessa pesquisa, e essas proteínas (que poderão nos ajudar a melhorar o seu tratamento) serão avaliadas em conjunto com alguns dados coletados em consultas anteriores que fazem parte de uma outra pesquisa da qual você já participa, sobre a determinação do perfil da população de pacientes do PROTAHBI. Assim, o benefício de participar desta pesquisa é nos auxiliar a melhor compreender como esta doença afeta o organismo, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Os riscos envolvidos nessa pesquisa são mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores do PROTAHBI, sendo estes dados utilizados apenas para esta pesquisa. Futuros exames poderão ser necessários para que os médicos possam acompanhá-lo melhor.

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA

08/12/2010

nº 100191 83

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada.

Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto do benefício esperado. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa de acordo com estas informações, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento (ou de meu familiar).

Fui informado que caso existam danos à minha pessoa ou saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei facilitado meu acesso a tratamento médico adequado.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável  
Nome do participante:

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador  
Nome do pesquisador:

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com o participante e a outra arquivada pelo pesquisador.

Em caso de qualquer outra dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve ou sobre os seus direitos, você deverá contatar a pesquisadora Bianca Pfaffenseller, pelo telefone: (51) 3359-8845.

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA  
08/12/2010  
nº 100191 83

## **ANEXO D**

Protocolos aplicados no recrutamento de Controles e Pacientes para o projeto.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
LABORATÓRIO DE PSIQUIATRIA MOLECULAR

**CONTROLES**

*Projeto 10-0191 (Pesquisadora Bianca Pfaffenseller)*

DATA:

ENTREVISTADOR:

**Identificação**

Nome Completo: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Sexo:  masculino  feminino

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

Etnia:  branco  não-branco

Escolaridade: \_\_\_\_\_ Grau  Completo  Incompleto (\_\_\_\_\_ anos de estudo completos)

**1)** Já houve um período em que você esteve com humor anormal (persistentemente elevado, expansivo ou irritável...)

Sim. Quanto tempo durou? Pelo menos uma semana? \_\_\_\_\_

Você teve que ser internado?  Sim  Não

Não

**2)** Você tem ou teve alguma doença neurológica (epilepsia, demência, perda de memória ou batida forte na cabeça com desmaio e internação) ou transtorno psiquiátrico com diagnóstico médico?

Sim  Não

**3)** Você já usou ou usa alguma medicação psiquiátrica?  Sim  Não

Caso sim, este uso é:  atual  passado  há mais de trinta dias

Este(s) medicamento(s) foram utilizado(s):  com prescrição médica  automedicação

Qual o motivo? \_\_\_\_\_

Qual ou quais medicações? \_\_\_\_\_

**4)** História familiar (com diagnóstico médico ou internação psiquiátrica) de doença neurológica (demência ou perda de memória) ou transtorno psiquiátrico em parentes de 1º grau:

Sim  Não

Caso sim, qual doença? \_\_\_\_\_

**5)** Você tem algum problema de saúde?  Hipertensão  Diabetes  Asma  Outro: \_\_\_\_\_

**6)** Você fuma?  Sim. Este hábito é:  Atual  Passado  Há mais de 6 meses  Não

**7)** Você ingere álcool?  Sim. Com que frequência? \_\_\_\_\_  Não

**8)** Está ou esteve gripado/resfriado nos últimos dias?

Sim. Há quantos dias? \_\_\_\_\_  Não

**9)** Pressão arterial: \_\_\_\_\_

**10)** Peso (Kg): \_\_\_\_\_ Altura (m): \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
LABORATÓRIO DE PSIQUIATRIA MOLECULAR

**PACIENTES**

*Projeto 10-0191 (Pesquisadora Bianca Pfaffenseller)*

---

DATA:

ENTREVISTADOR:

Nome Completo: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

Idade: \_\_\_\_

Etnia: ( ) Branco ( ) Não-Branco

Anos de estudo: \_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Idade do primeiro episódio: \_\_\_\_\_

Idade do diagnóstico: \_\_\_\_\_

Número de episódios: \_\_\_\_\_

Você fuma? ( ) Sim ( ) Não

Caso sim, este hábito é: ( ) Atual ( ) Passado ( ) Há mais de 6 meses

Você ingere álcool? ( ) Sim. Com que frequência? \_\_\_\_\_ ( ) Não

Algum problema de saúde?

( ) Não

( ) Sim. Qual (ais)?

( ) Hipertensão

( ) Doenças com alterações da resposta inflamatória (doenças reumáticas, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, *diabetes mellitus*, *AIDS*)

( ) Doenças auto-imunes ou com história de infecções agudas, crônicas ou de repetição

( ) Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson ou outra doença neurodegenerativa

Está ou esteve gripado/resfriado nos últimos dias?

( ) Não ( ) Sim. Há quantos dias? \_\_\_\_\_

Peso atual: \_\_\_\_\_

Altura atual: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

**Medicações Atuais (TODAS), em uso e respectivas doses:**

Medicação (nome genérico)	Dose/dia (com unidade) ou total de comprimidos/cápsulas ou outras formas utilizadas	Finalidade
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		

YMRS

1.	7.
2.	8.
3.	9.
4.	10.
5.	11.
6.	Total:

HAM-D

1.	10.
2.	11.
3.	12.
4.	13.
5.	14.
6.	15.
7.	16.
8.	17.
9.	Total:

**1. HUMOR E AFETO ELEVADOS**

- 0 - Ausência de elevação do humor ou afeto.
- 1 - Humor ou afeto discreta ou possivelmente aumentados, quando questionado.
- 2 - Relato subjetivo de elevação clara do humor; mostra-se otimista, autoconfiante, alegre; afeto apropriado ao conteúdo do pensamento.
- 3 - Afeto elevado ou inapropriado ao conteúdo do pensamento; jocoso.
- 4 - Eufórico; risos inadequados, cantando.

**2. ATIVIDADE MOTORA – ENERGIA AUMENTADA**

- 0 - Ausente.
- 1 - Relato subjetivo de aumento da energia ou atividade motora.
- 2 - Apresenta-se animado ou com gestos aumentados.
- 3 - Energia excessiva; às vezes hiperativo; inquieto (mas pode ser acalmado).
- 4 - Excitação motora; hiperatividade contínua (não pode ser acalmado).

**3. INTERESSE SEXUAL**

- 0 - Normal; sem aumento.
- 1 - Discreta ou possivelmente aumentado.
- 2 - Descreve aumento subjetivo, quando questionado.
- 3 - Conteúdo sexual espontâneo; discurso centrado em questões sexuais; auto-relato de hipersexualidade.
- 4 - Relato confirmado ou observação direta de comportamento explicitamente sexualizado, pelo entrevistador ou outras pessoas.

**4. SONO**

- 0 - Não relata diminuição do sono.
- 1 - Dorme menos que a quantidade normal, cerca de 1 hora a menos do que o seu habitual.
- 2 - Dorme menos que a quantidade normal, mais que 1 hora a menos do que o seu habitual.
- 3 - Relata diminuição da necessidade de sono.
- 4 - Nega necessidade de sono.

**5. IRRITABILIDADE**

- 0 - Ausente.
- 1
- 2 - Subjetivamente aumentada.
- 3
- 4 - Irritável em alguns momentos durante a entrevista; episódios recentes (nas últimas 24 horas) de ira ou irritação na enfermaria.
- 5
- 6 - Irritável durante a maior parte da entrevista; ríspido e lacônico o tempo todo.
- 7
- 8 - Hostil; não cooperativo; entrevista impossível.

**6. FALA**

- 0 - Sem aumento.
- 1
- 2 - Percebe-se mais falante do que o seu habitual
- 3
- 4 - Aumento da velocidade ou quantidade da fala em alguns momentos; verborréico, às vezes (com solicitação, consegue-se interromper a fala).
- 5
- 6 - Quantidade e velocidade constantemente aumentadas; dificuldade para ser interrompido (não atende a solicitações; fala junto com o entrevistador).
- 7
- 8 - Fala pressionada, ininterruptível, contínua (ignora a solicitação do entrevistador).

## **7. LINGUAGEM**

- 0 - Sem alterações.
- 1 - Circunstancial; pensamentos rápidos.
- 2 - Perde objetivos do pensamento; muda de assuntos frequentemente; pensamentos muito acelerados.
- 3 - Fuga de idéias; tangencialidade; dificuldade para acompanhar o pensamento; ecolalia consonante.
- 4 - Incoerência; comunicação impossível.

## **8. CONTEÚDO**

- 0 - Normal
- 1
- 2 - Novos interesses e planos compatíveis com a condição sócio-cultural do paciente, mas questionáveis.
- 3
- 4 - Projetos especiais totalmente incompatíveis com a condição sócio-econômica do paciente; hiper-religioso.
- 5
- 6 - Idéias supervalorizadas.
- 7
- 8 - Delírios.

## **9. COMPORTAMENTO DISRUPTIVO AGRESSIVO**

- 0 - Ausente, cooperativo.
- 1
- 2 - Sarcástico; barulhento, às vezes, desconfiado.
- 3
- 4 - Ameaça o entrevistador; gritando; entrevista dificultada.
- 5
- 6 - Agressivo; destrutivo; entrevista impossível.

## **10. APARÊNCIA**

- 0 - Arrumado e vestido apropriadamente.
- 1 - Descuidado minimamente; adornos ou roupas minimamente inadequados ou exagerados.
- 2 - Precariamente asseado; despenteado moderadamente; vestido com exagero.
- 3 - Desgrenhado; vestido parcialmente; maquiagem extravagante.
- 4 - Completamente descuidado; com muitos adornos e adereços; roupas bizarras.

## **11. INSIGHT**

- 0 - Insight presente: espontaneamente refere estar doente e concorda com a necessidade de tratamento.
- 1 - Insight duvidoso: com argumentação, admite possível doença e necessidade de tratamento.
- 2 - Insight prejudicado: espontaneamente admite alteração comportamental, mas não a relaciona com a doença, ou discorda da necessidade de tratamento.
- 3 - Insight ausente: com argumentação, admite de forma vaga alteração comportamental, mas não a relaciona com a doença, ou discorda da necessidade de tratamento
- 4 - Insight ausente: nega a doença, qualquer alteração comportamental e necessidade de tratamento.



**1. HUMOR DEPRIMIDO** (tristeza, desesperança, inutilidade)

- 0 - Ausente.
- 1 - Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.
- 2 - Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.
- 3 - Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro.
- 4 - Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não-verbal do paciente.

**2. SENTIMENTOS DE CULPA**

- 0 - Ausente
- 1 - Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros.
- 2 - Idéias de culpa ou ruminção sobre erros passados ou más ações.
- 3 - A doença atual é um castigo.
- 4 - Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

**3. SUICÍDIO**

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

**4. INSÔNIA INICIAL**

- 0 - Sem dificuldades para conciliar o sono.
- 1 - Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora.
- 2 - Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites.

**5. INSÔNIA INTERMEDIÁRIA**

- 0 - Sem dificuldades.
- 1 - O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite.
- 2 - Acorda à noite - qualquer saída da cama marcar 2( exceto p/ urinar).

**6. INSÔNIA TARDIA**

- 0 - Sem dificuldades.
- 1 - Acorda de madrugada, mas volta a dormir
- 2 - Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama.

**7. TRABALHO E ATIVIDADES**

- 0 - Sem dificuldades.
- 1 - Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades, trabalho ou passatempos.
- 2 - Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade).
- 3 - Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas
- 4 - Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda.

**8. RETARDO** (lentidão de idéias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)

- 0 - Pensamento e fala normais.
- 1 - Leve retardo à entrevista.
- 2 - Retardo óbvio à entrevista.
- 3 - Entrevista difícil.

4 - Estupor completo.

### **9. AGITAÇÃO**

0 - Nenhuma.

1 - Inquietude.

2 - Brinca com as mãos, com os cabelos, etc.

3 - Mexe-se, não consegue sentar quieto.

4 - Torce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios.

### **10. ANSIEDADE PSÍQUICA**

0 - Sem dificuldade.

1 - Tensão e irritabilidade subjetivas.

2 - Preocupação com trivialidades.

3 - Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.

4 - Medos expressos sem serem inquiridos.

### **11. ANSIEDADE SOMÁTICA**

Concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como: Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructação; Cardiovasculares: palpitações, cefaléia; Respiratórios: hiperventilação, suspiros; Frequência urinária; Sudorese.

0 - Ausente

1 - Leve

2 - Moderada

3 - Grave

4 - Incapacitante

### **12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTRINTESTINAIS**

0 - Nenhum

1 - Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdome

2 - Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos.

### **13. SINTOMAS SOMÁTICOS EM GERAL**

0 - Nenhum

1 - Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaléia, mialgias. Perda de energia e cansaço.

2 - Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2.

### **14. SINTOMAS GENITAIS (perda da libido, distúrbios menstruais)**

0 - Ausentes

1 - Leves

2 - Intensos

### **15. HIPOCONDRIA**

0 - Ausente

1 - Auto-observação aumentada (com relação ao corpo)

2 - Preocupação com a saúde

3 - Queixas freqüentes, pedidos de ajuda, etc.

4 - Idéias delirantes hipocondríacas.

### **16. PERDA DE PESO (Marcar A ou B)**

A) Quando avaliada pela história clínica

0 - Sem perda de peso.

1 - Provável perda de peso associada à moléstia atual.

2 - Perda de peso definida ( de acordo com o paciente)

3 - Não avaliada.

B) Avaliada semanalmente pelo psiquiatra responsável, quando são medidas alterações reais de peso

0 - Menos de 0,5 Kg de perda por semana.

- 1 - Mais de 0,5 Kg de perda por semana.
- 2 - Mais de 1 Kg de perda por semana.
- 3 - Não avaliada.

### **17. CONSCIÊNCIA**

- 0 - Reconhece que está deprimido e doente.
- 1 - Reconhece a doença mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc.
- 2 - Nega estar doente.